

Wirtszellinfektion durch *Salmonella* Typhimurium:
Charakterisierung von neuen Genen
mit Virulenzfaktorpotential

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Katrin Jaschinski
aus Blankenburg (Harz)

1. Referentin: Professorin Dr. Antje Flieger
2. Referent: Professor Dr. Michael Steinert
eingereicht am: 27.06.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.09.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Jaschinski, K., Bender, J.K., Rastew, E., Flieger, A.: Screening for novel virulence determinants of *Salmonella* Typhimurium using an amoeba infection model. (Poster) 1st North-Regio-Day on Infection (NORDI), Braunschweig (2010)

Jaschinski, K., Bender, J.K., Rastew, E., Flieger, A.: Screening for novel virulence determinants of *Salmonella* Typhimurium using an amoeba infection model. (Poster) 9th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM), Wernigerode (2010)

Jaschinski, K., Bender, J.K., Rastew, E., Flieger, A.: Screening for novel virulence determinants of *Salmonella* Typhimurium using an amoeba infection model. (Poster) 3rd Joint Conference der 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover (2010)

Jaschinski, K., Bender, J.K., Rastew, E., Flieger, A.: Screening for novel virulence determinants of *Salmonella* Typhimurium using an amoeba infection model. (Poster) *Salmonella: Biology, Pathogenesis & Prevention*, ASM Conferences, Aix-En-Provence, France (2009)

Jaschinski, K., Flieger, A.: Screening for novel virulence determinants of *Salmonella*. (Vortrag) Mini Symposium “Biochemistry of Host-Pathogen Interactions”, Kloster Banz (2009).

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

VII

1. Einleitung	1
1.1 <i>Salmonella</i> spp.	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Ökologie von <i>Salmonella</i> Typhimurium	2
1.1.2.1 Interaktionen von Bakterien mit freilebenden Amöben	3
1.1.2.2 Interaktion zwischen bakteriellen Pathogenen und <i>Acanthamoeba</i> spp.	4
1.1.2.3 Interaktion zwischen <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Acanthamoeba</i> spp.	5
1.2 Durch Salmonellen verursachte Infektion – Die Salmonellose	6
1.2.1 Salmonellose beim Menschen	7
1.2.1.1 Enteritische Salmonellosen	7
1.2.1.2 Typhoide Salmonellosen	7
1.2.2 Salmonellose beim Tier	8
1.2.3 Pathogenese der Salmonelleninfektion	9
1.2.4 <i>Salmonella</i> Virulenzfaktoren	11
1.2.4.1 Phospholipasen	14
1.2.4.1.1 Eigenschaften und Klassifizierung von Phospholipasen	15
1.2.4.1.2 Phospholipasen als bakterieller Virulenzfaktor	17
1.2.4.1.3 Patatin-ähnliche Phospholipasen als Virulenzfaktor	18
1.3 Ziel der Arbeit	19
 2. Material	 20
2.1 Laborausstattung	20
2.2 Spezielle Materialien	20
2.3 Chemikalien	21
2.4 Lipidsubstrate	22
2.5 Puffer und Lösungen	22
2.6 Enzyme, Standards, Antikörper	23
2.7 Kits	24
2.8 Plasmide	24
2.9 Oligonukleotide	25
2.10 Verwendete Bakterien und Zellen	27
2.11 Verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)	28
2.12 Kulturmedien für Bakterien und Zellen	30
2.13 Verwendete Software	32

3. Methoden	33
3.1 Anzucht von Bakterien	33
3.1.1 <i>Salmonella</i>	33
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	33
3.2 Herstellung von Glycerolgefrierkulturen	34
3.3 Anzucht von Zellkulturen	34
3.4 Koinfektion von Amöben, Makrophagen und Epithelzellen mit Salmonellen	35
3.4.1 Infektion von Amöben	35
3.4.2 Infektion von Makrophagen	36
3.4.3 Infektion von Epithelzellen	37
3.5 Grundlegende Nukleinsäure-Techniken	38
3.5.1 Isolierung genomischer DNA	38
3.5.2 Isolierung extrachromosomaler DNA	38
3.5.3 RNA-Isolierung	39
3.5.4 Restriktionsverdau/ Dephosphorylierung	39
3.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.5.6 Fällung von Nukleinsäuren mittels EtOH	40
3.5.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40
3.5.8 Reverse Transkriptase (RT)-PCR	41
3.5.9 Einfügen von Punktmutationen	42
3.5.10 Sequenzierung	43
3.6 Herstellung von <i>Salmonella Typhimurium knockout</i>-Mutanten	43
3.6.1 Herstellung von Mutagenesekonstrukten mittels PCR	44
3.6.2 Bakterienmutantenerzeugung mittels P22 Phagentransduktion	46
3.6.2.1 Erzeugung transduzierender P22-Lysate	47
3.6.2.2 Transduktion und Selektion	47
3.6.2.3 Deletion des Resistenzmarkers	47
3.7 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Salmonella</i> und <i>E. coli</i>	48
3.7.1 Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> und <i>Salmonella</i>	48
3.7.2 Herstellung von chemischkompetenten <i>E. coli</i>	49
3.7.3 Transformation von DNA	49
3.7.3.1 Hitzeschock Transformation	49
3.7.3.2 Elektroporation	50
3.8 Elektrophoresen und Western Blot	51
3.8.1 Nukleinsäure-Gelelektrophorese	51
3.8.2 SDS-PAGE	51
3.8.3 Immunochemischer Nachweis von Proteinen im Western Blot	52
3.9 Expression und Reinigung von Protein	53
3.9.1 Expression und Zellaufschluss	54
3.9.2 Proteinreinigung	55
3.10 Immun-/ Fluoreszenzmikroskopie	55
3.10.1 Fixierung von Zellen	55
3.10.2 Immunfärbung von Präparaten	55
3.11 Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben	56
3.11.1 Screen der Tn5-Mutanten	56
3.11.2 Identifizierung der Transposoninsertionsorte	57

INHALTSVERZEICHNIS

3.12 Amöben-Plattenassay	59
3.12.1 Plaqueassay	59
3.12.2 Amöbenresistenztest	59
3.13 Nachweis von Phospholipaseaktivität	60
3.13.1 Gewinnung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen	60
3.13.2 Verdau von Lipidsubstraten	60
3.13.3 Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren	61
4. Ergebnisse	62
4.1 Identifizierung von <i>Salmonella</i> Genen mit Bedeutung für die Bakterien-Amöben-Interaktion	62
4.1.1 Transposon-Mutagenese	62
4.1.1.1 Berechnung der Wahrscheinlichkeit für die Genomabdeckung	63
4.1.2 Scatterphänotyp für <i>Salmonella</i>	63
4.1.3 Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben	65
4.1.4 Untersuchung der SPI-1 Effektorproteinsekretion der Scatterklone	67
4.1.5 Tn5-Lokalisation in den STM Transposon-Mutanten	69
4.2 Testung der Scatterklone in verschiedenen Infektionsmodellen	72
4.2.1 Infektion nicht-phagozytierender Zellen mit <i>Salmonella</i>	73
4.2.2 Infektion phagozytierender Zellen mit <i>Salmonella</i>	76
4.3 Etablierung eines Amöbeninfektionsmodells	79
4.3.1 Analyse von <i>rpoS</i> in verschiedenen <i>Salmonella</i> Stämmen	86
4.3.1.1 Analyse der <i>rpoS</i> Sequenzen in verschiedenen <i>Salmonella</i> WT-Stämmen	86
4.3.1.2 Infektionsverhalten von STM <i>rpoS</i> -Mutanten in etablierten Infektionsmodellen	87
4.3.2 Amöben-Salmonellen-Interaktion im Agarplattenassay	88
4.4 Charakterisierung Patatin-ähnlicher Proteine von <i>Salmonella</i> Typhimurium	91
4.4.1 Sequenzvergleiche von <i>Salmonella</i> Patatin-ähnlichen Proteinen	91
4.4.2 <i>In silico</i> Analyse von <i>Salmonella yjjU</i> und <i>yehK</i>	93
4.5 Herstellung <i>Salmonella</i> knockout-Mutanten	95
4.5.1 Herstellung des Integrationselements	96
4.5.2 Einbringen des Integrationselements in den Zielstamm und Verifizierung der kanamycinresistenten <i>knockout</i> -Mutanten	96
4.5.3 Herstellung markerloser <i>knockout</i> -Mutanten	98
4.5.4 Herstellung und Verifizierung einer PLP Doppel- <i>knockout</i> -Mutante	98
4.6 Phänotypische Charakterisierung von <i>Salmonella</i> PLP <i>knockout</i>-Mutanten	99
4.6.1 <i>Salmonella</i> PLP <i>knockout</i> -Mutanten vermehren sich in Laborkultur	99
4.7 Untersuchung der lipolytischen Aktivität von PLP in <i>Salmonella</i>	100
4.8 Klonierung von STM <i>yjjU</i> und <i>yehK</i> in den pBAD-TOPO Vektor	101
4.8.1 Generierung von Mutanten im putativ katalytisch aktiven Serin von STM YjjU und YehK	102
4.9 Untersuchung der lipolytischen Aktivität von PLP in <i>E. coli</i>	103
4.9.1 Reinigung der 6×His-getagten Proteine	104
4.9.2 Lipolytische Aktivität der rekombinanten Patatin-ähnlichen Proteine	105

INHALTSVERZEICHNIS

4.10 Untersuchung der PLP Sekretion in <i>Salmonella</i>	107
4.11 Analyse der PLP Mutanten in verschiedenen Infektionsmodellen	108
5. Diskussion	110
5.1 Identifizierung von <i>Salmonella</i> Typhimurium Virulenzgenen mit Bedeutung für die Wirtszellinfektion	110
5.1.1 Screen auf <i>Salmonella</i> Suszeptibilität gegenüber Amöben	110
5.1.1.1 Das Amöbeninfektionsmodell	117
5.1.2 Charakterisierung von Patatin-ähnlichen Proteinen bei <i>Salmonella</i> Typhimurium	122
5.1.2.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium besitzt zwei Patatin-ähnliche Proteine	122
5.1.2.2 Lipolytische Aktivität der Patatin-ähnlichen Proteine	123
5.1.2.2.1 Die Rolle der Patatin-ähnlichen Proteine bei <i>Salmonella</i>	125
6. Literaturverzeichnis	129
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XII
DANKSAGUNG	XIII

Zusammenfassung

Um zum Verständnis der Wirtszellinfektionsverläufe von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) beizutragen, befasst sich diese Arbeit mit der Identifizierung und Charakterisierung neuer potentieller Virulenzgene dieses bedeutenden zoonotischen Infektionserregers. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt.

Um neue Virulenzgene aufzufinden, wurden im ersten Teil der Arbeit in einem agarbasierten Amöben-Screening-Modell zwei *Salmonella* Tn5-mutagenisierte Klonbänke auf Klone mit Suszeptibilität gegenüber *Acanthamoeba castellanii* getestet. Salmonellen, wie auch andere intrazelluläre Pathogene, sind in der Lage in freilebenden Amöben zu überleben und sich zu replizieren. Wenn potentiell essentielle Gene durch die Mutagenese inhibiert wurden, sollte sich in der Interaktion mit Amöben eine strahlenförmige Koloniemorphologie zeigen. In Vorversuchen wurden 60 *Salmonella* Mutanten mit dem Scatterphänotyp gefunden, welcher auf einen Resistenzverlust der Bakterien gegenüber den Amöben hindeutete. In der vorliegenden Arbeit wurden, in den isolierten putativ avirulenten Scatterklonen, Transposonlokalisationen in bekannten Virulenz-assoziierten Genen wie *purD*, *lpfE* und *udg* sowie in weiteren Genen mit potenzieller metabolischer, Chaperon-, Transport-, oder hypothetischer Funktion nachgewiesen. Wie die Testung der Scatterklone auf ihre quantitative Infektionsfähigkeit in phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zelllinien zeigte, spielte jedoch keines der gefundenen Gene hierfür eine essentielle Rolle. Möglicherweise sind die identifizierten Gene aber bedeutend für die Salmonellen-Amöben-Interaktion, was zukünftig in einem effektiven quantitativen Amöbeninfektionsmodell geprüft werden sollte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die strahlenförmige Koloniemorphologie mit der Motilität der Amöben und vermutlich weniger mit der durch die Mutation gewonnenen Suszeptibilität gegenüber Amöben zusammenhängt. Somit stellt dieser Screening Ansatz für *Salmonella*, im Gegensatz zu *Legionella*, kein geeignetes Modell zur Identifikation neuer Virulenzgene dar.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden *Salmonella* Patatin-ähnliche Proteine charakterisiert und hinsichtlich ihrer hypothetischen Funktion als Virulenzfaktoren getestet, da für verschiedene Patatin-ähnliche Proteine gramnegativer Bakterien die Bedeutung in der Virulenz beschrieben ist. Über Genomsequenzanalysen zu bekannten Patatin-ähnlichen Proteinen wurde zum ersten Mal gezeigt, dass *S. Typhimurium* zwei Patatin-ähnliche Proteine besitzt, annotiert als YchK

ZUSAMMENFASSUNG

und YjjU. Homologe Proteine dieser beiden Patatin-ähnlichen Proteine wurden auch in der Spezies *S. bongori* gefunden und kommen neben der *S. enterica* Subspezies I nur noch in der Subspezies IIIa vor. In beiden *Salmonella* Patatin-ähnlichen Proteinen, wie auch in anderen bakteriellen Patatin-ähnlichen Proteinen, kommen die charakteristischen Aminosäuren in vier konservierten Blöcken vor und sie besitzen eine katalytische Ser-Asp Diade. Mit rekombinant exprimierten affinitätschromatografisch gereinigtem YjjU-V5/ 6×His und YchK-V5/ 6×His wurde Phospholipase A Aktivität mit Substratspezifität beider Proteine vor allem gegenüber dem Diazyl-Phospholipid Phosphatidylglyzerol als auch gegenüber Phosphatidylcholin gezeigt. Sie sind zudem in der Lage Lysophospholipide zu deazylieren. Die signifikant reduzierte Phospholipase A Aktivität generierter Serinmutanten im G-X-S-X-G Lipase-Konsensusmotiv zeigte, dass das zentrale Serin zur Entwicklung der lipolytischen Aktivität benötigt wird. *In vitro* Infektionsexperimente mit *S. Typhimurium* *ychK*- und *yjjU*-Deletionsmutanten zeigten eine Entbehrlichkeit der einzelnen als auch beider Gene hinsichtlich der Invasions- und intrazellulären Replikationsfähigkeit. Zukünftig sollte geprüft werden, ob die *Salmonella* Patatin-ähnlichen Proteine *in vivo* eine Virulenz-assoziierte Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde erstmalig für zwei Patatin-ähnliche Proteine von *S. Typhimurium*, welche zur Pathogenese der Salmonellose beitragen könnten, Phospholipase A Aktivität bewiesen.

1. Einleitung

Trotz aller Fortschritte der modernen Medizin, stellen Infektionskrankheiten auch in der heutigen Zeit noch ein großes gesundheitliches Risiko dar. Unter dem Aspekt der Priorisierung übertragbarer Infektionserreger werden *Salmonella* spp. gegenwärtig als Erreger mit höchster Priorität betrachtet [1].

1.1 *Salmonella* spp.

Salmonellen gehören phylogenetisch zu den γ -Proteobakterien und werden dort zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gezählt. Sie divergierten vom Genus *Escherichia* vor etwa 120 - 160 Millionen Jahren [2, 3]. Die Genusbezeichnung *Salmonella* ist auf den amerikanischen Bakteriologen Daniel E. Salmon (1850 - 1914) zurückzuführen, der den 1885 beschriebenen „Hogcholera-Bacillus“ *Salmonella choleraesuis* benannt hat. Das Bakterium *Salmonella* wurde aber bereits 1880 durch Eberth mikroskopisch nachgewiesen und vier Jahre später erstmals von Gaffky kultiviert [4].

1.1.1 Taxonomie

Die gramnegativen, fakultativ anaeroben, sporenlosen, stäbchenförmigen Salmonellen sind ca. $0,7 - 1,5 \times 2,0 - 5,0 \mu\text{m}$ groß und bis auf wenige Ausnahmen (*S. Pullorum* und *S. Gallinarum*) peritrich begeißelt. Die Einteilung der Salmonellen erfolgt unter biochemischen, sowie hauptsächlich unter serologischen Gesichtspunkten gemäß den hypervariablen Lipopolysacchariden (O-Antigene) und den Geißelproteinen (H-Antigene), sowie in einigen wenigen Fällen den Kapselantigenen (Vi-Antigen von *S. Typhi*), wobei für die Klassifizierung das Kauffmann-White-Schema maßgeblich ist. Nach den heutigen Kenntnissen wird der Genus *Salmonella* in zwei Spezies unterteilt, *S. bongori* und *S. enterica*. *Salmonella enterica* wird wiederum in sechs Subspezies (subsp.) untergliedert: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica* (Abb. 1.1) [5]. *S. enterica* subsp. *enterica* infiziert meist Warmblüter, aber auch Kaltblüter. Die anderen Subspezies hingegen findet man als Erstbesiedler generell nur in Kaltblütern, diese Erreger können jedoch weiter auf Warmblüter übertragen werden. Die *Salmonella* Spezies und Subspezies werden weiter in

EINLEITUNG

Serovare unterteilt. Nur für Serovare, die zur Subspezies I gehören, wird ein Name festgelegt, der nach klinischen Gesichtspunkten bzw. auf den Ort der erstmaligen Isolierung zurückzuführen ist und nach neuer Nomenklatur- Vorschrift groß und nicht kursiv geschrieben wird, z. B. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium oder kurz *S.* Typhimurium. Bei Serovaren anderer Subspezies wird nach der Subspezies die entsprechende Antigenformel angegeben. Die Antigenformeln aller *Salmonella* Serovare sind im Kauffmann-White-Schema aufgelistet, zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind mehr als 2500 verschiedene Serovare bekannt [6].

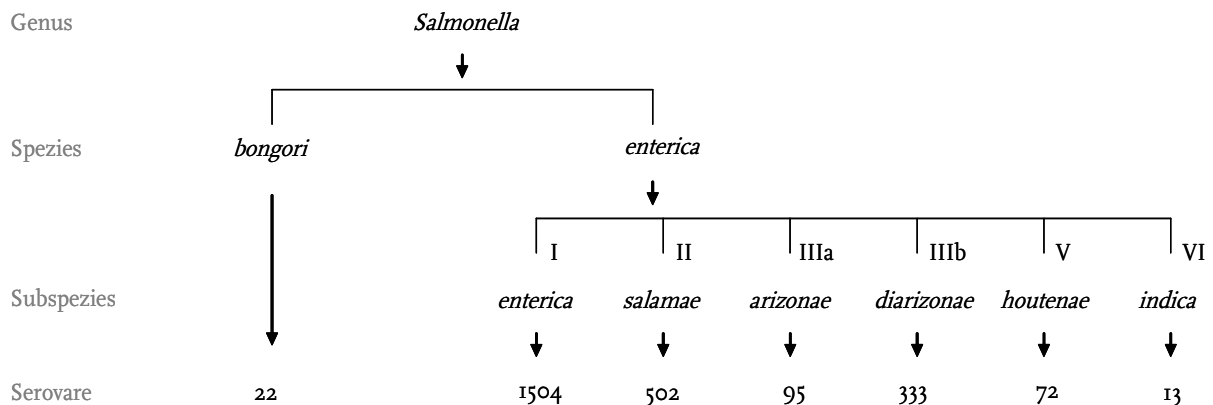


Abbildung 1.1: Taxonomische Einteilung der Gattung *Salmonella*. Die Ziffern geben die unterschiedliche Anzahl der Serovare für die jeweilige Spezies bzw. Subspezies an, insgesamt sind 2541 Serovare bekannt [6].

1.1.2 Ökologie von *Salmonella* Typhimurium

Salmonellen sind ubiquitär v. a. in der Tierwelt verbreitet, sie kommen aber auch in der Umwelt vor und können hier ein breites Spektrum ökologischer Nischen besiedeln. Diese sehr anpassungsfähigen Bakterien sind in der Lage unter verschiedenen Umweltbedingungen zu wachsen und zu überleben. Sie können sich beispielsweise in einem Temperaturbereich von 4°C bis 45°C vermehren und überstehen das Einfrieren bei -18°C bis -20°C. Gegen niedrige pH-Werte sind sie widerstandsfähig. Allerdings kommt es bei pH-Werten < 4,0 und > 9,0 zu nur kurzen Überlebenszeiten. Sie besitzen eine hohe Tenazität, d. h. in der Umwelt oder (trockenen) Lebensmitteln können sie wochen- bis monatelang, unter Umständen Jahre überleben. Nach Studien von Beer (1982) und Schöning (1999) beträgt die Überlebenszeit der Bakterien auf glatten Metalloberflächen: 14 Tage; in feuchter Erde: 1 Jahr; in getrocknetem Kot: 2,5 Jahre; im Abwasser: 2,7 Jahre; im Staub (bei Zimmertemperatur): 4 Jahre [7, 8].

EINLEITUNG

Neben dem Vorkommen von *S. Typhimurium* in landwirtschaftlichen Nutztieren, Mäusen, Schadinsekten, Vögeln, Reptilien und Fischen findet man die Erreger auch in Boden, Ab- und Oberflächengewässern [9]. In diesen Umwelthabitaten treten sie mit einer Vielzahl anderer Bakterien, Pflanzen und Protozoen in engen Kontakt.

Nachdem verstanden wurde, dass humanpathogene Erreger aus tierischen Reservoiren verbreitet werden können, erkannte man auch frisches Obst und Gemüse als neue Vehikel für die Übertragung dieser zoonotischen Krankheitserreger an [10]. Häufig werden auch Pflanzen, wie Tomaten und Sprossen von Salmonellen besiedelt [11-13]. Obwohl von ihnen Pflanzenabwehrkräfte induziert werden, können Salmonellen effektive Endophyten sein. Zudem trägt die Pflanzen-assoziierte Mikroflora zur Fitness des Krankheitserregers bei [14]. Zu der natürlichen pflanzlichen Mikroflora gehören auch Protozoen. Mehrere Arten von Amöben wurden in Verbindung mit frischem Salat und Gemüse gefunden [15], auch *Tetrahymena pyriformis* wurde aus Spinat isoliert. [16]. Die Interaktion bzw. Besiedlung von Protozoen und Amöben durch Bakterien [17-19] ist von besonderem Interesse, weil sich Bakterien in ihnen replizieren können, die Virulenz nach Protozoen- bzw. Amöbenpassage erhöht sein kann [20, 21], sowie in Protozoen ein bakterieller Gentransfer möglich ist [22].

1.1.2.1 Interaktion von Bakterien mit freilebenden Amöben

Ein interessanter Aspekt für das Überleben von *S. Typhimurium* in der Umwelt könnte der Kontakt mit Mikroorganismen, einschließlich Amöben sein. Freilebende Amöben sind wichtige Protozoen, die mikrobielle Gemeinschaften kontrollieren [23]. Sie haben zwei Entwicklungsstadien: die Trophozyte, eine vegetative fressende Form, und die Zyste, eine ruhende und ökologisch stabile Form [24].

Freilebende Amöben sind allgegenwärtig und werden aus verschiedenen natürlichen Quellen, wie Boden, Süß- und Salzwasser, Staub und Luft isoliert, aber auch häufig aus anthropogenen Ökosystemen wie Leitungswasser, Klimaanlage und Kühltürmen [25]. Freilebende Amöben, wie *Acanthamoeba* spp. werden zudem häufig auch im Darm von Menschen [26] und Reptilien [27] gefunden. Sie ernähren sich hauptsächlich von Bakterien, Pilzen und Algen durch Phagozytose. Einige Bakterien haben jedoch Mechanismen entwickelt, die Phagozytose durch freilebende Amöben zu überleben und sie als Wirte zu nutzen [25, 28, 29]. Beispielsweise wurden Bakterien der Gattung *Chlamydia* und *Bacteroides* aus natürlich vorkommenden Isolat von *Acanthamoeba* und *Hartmanella* isoliert [30, 31]. Auch

Salmonella wurde im Boden und Wasser des gleichen ökologischen Standortes mit *Acanthamoeba* Spezies entdeckt [15]. Es ist offensichtlich, dass Interaktionen von bakteriellen Pathogenen und Protozoen, wie Amöben eine Rolle in der Ökologie und dem Überleben der Bakterien in der Umwelt spielen.

1.1.2.2 Interaktion zwischen bakteriellen Pathogenen und *Acanthamoeba* spp.

Im Jahr 1954 wurde erstmals für *Acanthamoeba* eine Infektion mit Bakterien gezeigt [32]. Zeitgleich zum Nachweis von virulenten Legionellen in *Acanthamoeba* [33] wurde etabliert, dass *Acanthamoeba* Umweltbakterien als Nahrungsgrundlage nutzen. Sie interagieren sowohl mit grampositiven als auch gramnegativen Bakterien, letztere werden aber bevorzugt als Nahrungsquelle genutzt [34]. Seit 1975 ist zudem bekannt, dass Amöben Bakterien als Endosymbionten tragen [35]. Seitdem kommt der Fähigkeit von *Acanthamoeba* als ein bakterielles Reservoir, Vektor und Wirt für pathogene Bakterien viel Aufmerksamkeit zu [24]. Die Mehrheit der „beherbergten“ Bakterien sind humanpathogene Erreger [36], wie *Legionella pneumophila* [33], *Escherichia coli* O157 [37], *Coxiella burnetii* [38], *Pseudomonas aeruginosa* [39], *Vibrio cholerae* [40, 41], *Helicobacter pylori* [42], *Simkania negevensis* [43], *Listeria monocytogenes* [44] und *Mycobacterium avium* [45].

Im Lebenszyklus und Überleben von humanpathogenen Bakterien spielen freilebende Amöben eine entscheidende Rolle. Die Amöben können hierbei als „Trainingsfeld“ für das Überleben intrazellulärer Bakterien fungieren [25], wobei die Bakterien entscheidende Virulenzgene durch kontinuierliche Nutzung in Amöben konserviert haben könnten. Beispielsweise führt die Kokultivierung von *Mycobacterium avium* mit *Acanthamoeba castellanii* zu einer erhöhten Virulenz der Bakterien für die Infektion von Mäusen, durch das intraamöbische Überleben der Bakterien [21]. Andere *in vitro* Studien belegen, dass das Überleben von Koliformen und bakteriellen Krankheitserregern, einschließlich *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Legionella gormanii* und *Campylobacter jejuni* verbessert wird, wenn sich diese Bakterien während einer Chlorierung in Amöben befinden [17, 46, 47]. Amöben gelten darüber hinaus als Vektoren für die Übertragung von pathogenen Bakterien [48], wie am Beispiel von *Legionella pneumophila* gezeigt [49]. Diese bakteriellen Krankheitserreger können in Amöben nicht nur intrazellulär überleben, sondern sich in ihnen auch vermehren.

Letztlich können Bakterien Amöben für eine Übertragung in die Umwelt und zum Schutz in dieser bei bakterienschädlichen Bedingungen nutzen. Zudem dienen die Einzeller den Bakterien, um sich den immunologischen Abwehrmechanismen eines Wirts und/ oder chemotherapeutische Agenzien zu entziehen und sich in ausreichender Zahl zu vermehren, um eine Erkrankung hervorzurufen [36].

1.1.2.3 Interaktion zwischen *Salmonella* Typhimurium und *Acanthamoeba* spp.

Das Überleben von *Salmonella* Typhimurium innerhalb *Acanthamoeba castellanii* während einer Chlorierung wurde bereits 1988 durch King beschrieben, was auf einen schützenden intrazellulären Lebensraum für die Bakterien hinwies [46]. Später wurde die Fähigkeit der Salmonellen von Amöben internalisiert zu werden, in ihnen zu überleben und zu replizieren anhand drei ausgewählter Serotypen von *Salmonella enterica* und fünf verschiedenen Isolaten der *Acanthamoeba* Spezies evaluiert. Die Ergebnisse belegen, dass *Acanthamoeba* spp. in der Lage sind zwischen verschiedenen *Salmonella* Serovaren zu differenzieren. Die unterschiedliche Erkennung durch die Amöben wird hierbei über die verschiedenen O-Antigenmuster der Serovare vermittelt [17, 50]. Zudem zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Salmonella*-infizierten *Acanthamoeba rhysodes*, dass die Bakterien innerhalb membrangebundener Vakuolen lokalisiert sind [17]. Auch in kontraktilen Vakuolen von *Acanthamoeba polyphaga* wurde bereits *S. Typhimurium* nachgewiesen, wobei die Invasion mit einer Frequenz von 1:100 - 1000 beobachtet wurde. Die Anzahl des Pathogens, enthalten in den kontraktilen Vakuolen, erhöhte sich über die Infektionszeit, was eine intrazelluläre Replikation vermuten lässt. Zudem wurde beobachtet, dass Amöben die Dissemination von Salmonellen vermitteln, wobei sich bakterielle Mikrokolonien entlang einer Amöben-„Spur“ ausbilden. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine Amöbenbewegung in und aus der Bakterienkolonie beschrieben. Es wurde daher vermutet, dass Salmonellen in „fäkalen“ Pellets ausgeschieden werden und das nachfolgende Wachstum des Pathogens in diskreten Kolonien außerhalb der ersten Impfstelle stattfindet [18]. Das deutet auf ein intrazelluläres Überleben der Salmonellen in den Einzellern hin. Weitere Studien liefern ebenfalls den Nachweis einer Aufnahme und intrazellulären Vermehrung von *S. Typhimurium* in *Acanthamoeba polyphaga* [18, 19, 51].

Für die Virulenz von *Salmonella* sind verschiedene Pathogenitätsdeterminanten wichtig. Dazu zählen die sogenannten *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI) und die dazugehörigen

Effektoren (siehe 1.2.4). Wie im murinen Makrophagenmodell gezeigt, sind SPI-1 Gene für die Invasion in nicht-phagozytierende Zellen notwendig. SPI-2 Gene hingegen spielen eine entscheidende Rolle im intrazellulären Überleben der Erreger [52-54]. Diese Virulenzfaktoren sind ebenfalls in der Amöbeninteraktion von Bedeutung. Die Expression der SPI-1 und SPI-2 Gene wird während einer Amöbeninfektion hochreguliert [55] und das SPI-2 kodierte Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) und die sekretierten Effektoren scheinen wesentlich am Überleben von *S. Typhimurium* in freilebenden Amöben beteiligt zu sein [19, 55].

Die Theorie, dass die Regulation bakterieller Determinanten, wie auch für *Legionella pneumophila* gezeigt, für das Überleben in Amöben und in Makrophagen weitgehend analog ist, wird zudem durch die fehlende Überlebensfähigkeit einer *Salmonella* Δ *phoP* Mutante in *Acanthamoeba polyphaga* unterstützt [19]. Das PhoPQ Zwei-Komponenten-Regulationssystem gilt als Schlüssel zur Aktivierung des SPI-2 kodierte T3SS in Phagozyten [56, 57]. Ein zusätzliches Anzeichen, dass die Infektion von Makrophagen und Amöben ähnlich zu sein scheint, liefert die Beobachtung eines Apoptose-ähnlichen Zelltodes in *Acanthamoeba rhysodes* induziert durch *Salmonella* [55, 58]. Auch in anderen Protozoen, wie *Blastocystis hominis* und *Dictyostelium discoideum* wurde solch ein Zelltod gefunden [59, 60], der dem von *Salmonella* getriggerten programmierten Zelltod von humanen Makrophagen ähnlich ist [61].

Während einige Studien zum einen Hinweise für die Aufnahme und zum anderen auf die intrazelluläre Vermehrung von *S. Typhimurium* in *Acanthamoeba polyphaga* [18, 51] liefern, zeigen andere, dass *S. Typhimurium* nicht in *A. polyphaga* überleben kann [58]. Diese Unterschiede werden z. T. auf die verschiedenen Bakterienstämme und auf veränderte Versuchsbedingungen zurückgeführt [58]. Es sind daher weitere, detaillierte Untersuchungen erforderlich, um die Interaktion von Amöben mit Salmonellen zu erforschen.

1.2 Durch Salmonellen verursachte Infektion – Die Salmonellose

Die Salmonellose gehört zu den bedeutendsten Zoonosen des Menschen und ist trotz zahlreicher antiepidemischer und antiinfektiöser Strategien eine der am häufigsten registrierten lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten [62].

1.2.1 Salmonellose beim Menschen

Salmonellen sind für den Menschen obligat pathogene Erreger und verursachen infektiöse Enteritiden. Menschen infizieren sich am häufigsten über kontaminierte Lebensmittel, wie Eier oder Geflügelfleisch. Die minimale Infektionsdosis für Erwachsene liegt bei 10^4 bis 10^6 Keimen. Dagegen reicht bei Kindern, immungeschwächten Personen und in stark fetthaltigen Lebensmitteln, wie Schokolade oder Käse eine wesentlich geringere Keimzahl von weniger als 100 aus, um eine Infektion auszulösen [63].

Hervorgerufen wird die Salmonellose durch nichttyphoidale Salmonellen, durch *Salmonella enterica*, sehr selten durch *S. bongori*. Die beiden häufigsten Salmonellen Serovare stellen dabei *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* mit einem Anteil von respektive ca. 60% und ca. 20% an allen übermittelten Salmonellosen dar, wie das Robert Koch-Institut 2011 im Ratgeber für Ärzte berichtet [64]. Die typhoiden Erreger, *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B oder C, hingegen rufen systemische Infektionen mit Darmbeteiligung hervor.

1.2.1.1 Enteritische Salmonellosen

Eine akute Gastroenteritis entsteht nach oraler Aufnahme der *Salmonella*-Keime. Sie beginnt nach einer Inkubationszeit von ca. 8 - 48h mit typischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, später dann als akuter Brechdurchfall mit wässrigem, blutigem Stuhl. Durch den massiven Flüssigkeits- und Elektrolytverlust kann es zur Kreislaufschwäche oder gar zum Kreislaufkollaps kommen [65]. Die Erkrankung verläuft in der Regel als selbstlimitierende Infektion, deren Ausbreitung auf den Darm beschränkt bleibt. Nach überstandener Erkrankung besteht meist keine Immunität gegen erneute Salmonellose, jedoch gegen Infektionen mit dem gleichen Erregertyp. Bei Säuglingen, Kleinkindern und immungeschwächten Personen kann die anfangs enteritisch verlaufende Infektion auch systemisch werden und Symptome wie beim Typhus hervorrufen.

1.2.1.2 Typhoide Salmonellosen

Infektionen durch *S. Typhi* aber auch durch *S. Paratyphi* A, B und C sind in Deutschland meist importiert, am häufigsten aus Südostasien, aber auch aus Afrika, Mittel- und

EINLEITUNG

Südamerika. *S. Typhi* ist ausschließlich humanpathogen. Als wichtigstes Reservoir gelten Dauerausscheider. Die Ausscheidung erfolgt über den Stuhl und auch über den Urin [66]. Die Infektionsdosis liegt mit 10^3 Bakterien deutlich geringer als bei den Enteritissalmonellen. Fäkal kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser stellen auch hier die häufigste Infektionsquelle dar. *S. Paratyphi* A, B und C sind ebenso weitgehend an den Menschen adaptiert, sie werden aber auch, im Gegensatz zu *S. Typhi*, bei Tieren gefunden.

Typhus und Paratyphus sind hochfieberhafte Infektionen des retikuloendothelialen Systems und des intestinalen Lymphgewebes, die mit einer Bakteriämie/ Septikämie einhergehen [65], meistens verlaufen Paratyphusinfektionen jedoch leichter.

Die Krankheit beginnt nach einer Inkubationszeit von 8 - 15 Tagen meist schleichend mit Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen. Kurz nach der Erregeraufnahme kann es zu einer Enteritis kommen, die aber meist wieder abgeklungen ist, bevor die für den Typhus typischen Symptome auftreten. Charakteristisch sind z. B. ein hohes Fieber über 40°C, Splenomegalie und Roseolen in der Haut. Im Folgenden können auch Organmanifestationen auftreten und häufig besteht eine Bewusstseinsstrübung, was auch die Bezeichnung der Krankheit beschreibt (griech. *typhos* = Nebel). Unbehandelt endet die Infektion für 10 - 15% der Erkrankten letal. Bei rechtzeitig eingeleiteter antibiotischer Therapie, mit Fluorchinolonen oder Ceftriaxon, liegt die Letalität des Typhus unter 1%. Nach überstandener Typhus- und Paratyphusinfektion besteht meistens eine 3 bis 6 Jahre anhaltende Immunität.

1.2.2 Salmonellose beim Tier

Infektionen bei Tieren erfolgen analog zum Menschen in der Regel durch orale Aufnahme der Keime. Der Infektionsweg und die primären Symptome sind ähnlich einer enteritischen Salmonellose beim Menschen. Darüber hinaus kann hier ein chronischer Verlauf eintreten und bei einem schweren Krankheitsbild zum Tod führen.

Viele *Salmonella*-Serotypen weisen Wirtsspezifität auf. Huhnspezifisch sind *S. Gallinarum* und *S. Pullorum*, wobei letzterer vorwiegend bei Küken zu finden ist. *S. Dublin* befällt Rinder, *S. Abortusovis* ist schafspezifisch und *S. Abortusequi* ist ausschließlich bei Pferden nachzuweisen. *S. Choleraesuis* infiziert überwiegend Schweine, gelegentlich auch den Menschen.

EINLEITUNG

Zur Untersuchung der Salmonellose hat sich das Mausmodell als Standard-Tiermodell etabliert. Bei oralen Infektionen mit vielen *Salmonella* Serovaren reagieren die Mäuse mit Symptomen, die dem durch *S. Typhi* verursachten Typhus des Menschen sehr ähnlich sind. Um Wirts-Pathogen-Interaktionen zu untersuchen wird das sogenannte Maus-Typhoid-Modell verwendet und findet bis heute vielfältigen Einsatz [67, 68]. Bei Infektionen von Mäusen mit *S. Typhimurium* sind die gleichen Gewebe betroffen wie bei humanen Infektionen mit *S. Typhi*. Mit diesem Mausmodell wurden bereits einige essentielle Virulenzmechanismen von *S. Typhimurium* entdeckt und analysiert [69, 70]. Um die Pathogenese von *S. Typhimurium* zu analysieren werden heute Mauslinien, wie z. B. BALB/c verwendet [68]. Der BALB/c Mausstamm wurde von MacDowell 1923 aus einer Inzucht von Bagg Albino Mäusen (BALB) gezüchtet. 1935 fügte Dr. Snell der Bezeichnung BALB das "c" hinzu, da der Genotyp des „Farb“ locus *c/c* ist [71]. Darüber hinaus konnten mit Hilfe der Informationen der im Mausmodell attenuierten *S. Typhimurium* Stämme neue attenuierte und immunogene *S. Typhi* Impfstämme designiert werden [72]. Ein weiterer Modellorganismus zur Analyse der Pathogenität von *S. Typhimurium* ist der Nematode *Caenorhabditis elegans* [73]. *S. Typhimurium* kann im Darm von *C. elegans* proliferieren und eine persistente Infektion hervorrufen, was in einer erheblichen Verringerung der Überlebensrate der Nematoden resultiert [74].

1.2.3 Pathogenese der Salmonelleninfektion

Die Pathogenese von *Salmonella* lässt sich im Wesentlichen in drei Phasen einteilen: 1. Aufnahme und Magenpassage, 2. Adhärenz und 3. Invasion.

Nach oraler Aufnahme der Salmonellen überleben die Erreger die saure Umgebung des Magens mit Hilfe verschiedener Systeme von Protonenpumpen (z. B. *acid tolerance response*) [75]. Anschließend gelangen sie in den Dünndarm. Hier findet ihre Adhäsion an die Zellen des Dünndarmgewebes statt, wodurch sie der Darmperistaltik entkommen. Bewerkstelligt wird dies mittels Adhärenzfaktoren, wie beispielsweise Typ-I-Fimbrien. Als nächster Schritt im Infektionsverlauf kommt es zu einer engen Bindung der Erreger an die Zielzelle und ihre Kolonisation wird eingeleitet. Durch den Typ-III-Sekretionssystem-Apparat können daraufhin zahlreiche sogenannte Virulenz-assoziierte Effektorproteine in die Zielzelle „injiziert“ werden. Als Aggressine, Impedine, Invasine oder Moduline können sie den weiteren Verlauf der Infektion bestimmen. Invasine können hierbei Membranveränderungen

EINLEITUNG

der Wirtszelle einleiten, was eine Aufnahme der Erreger erleichtert. Moduline sind in der Lage metabolische Vorgänge der Zielzelle zu ändern. Aggressine hingegen bewirken zelluläre und metabolische Schäden der Wirtszelle. Proteine die als Impedine bezeichnet werden, sind an der Überwindung der Wirtszell-Immunabwehr beteiligt.

Beim enteritischen Verlauf triggern die Effektorproteine eine Fehlregulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes durch einen permanenten Efflux und einer induzierten aber lokalen Inflammation, was beides zum typischen *Salmonella* Durchfall mit Fieber und Erbrechen führt. Beim systemischen Verlauf der Salmonellose triggern zahlreiche Effektorproteine die Invasion der Erreger in die Zielzellen, sowie deren Überleben. Auch die intrazelluläre Vermehrung und deren Entkommen aus Phagolysosomen (bakteriämische Vermehrung) werden durch Effektorproteine vermittelt.

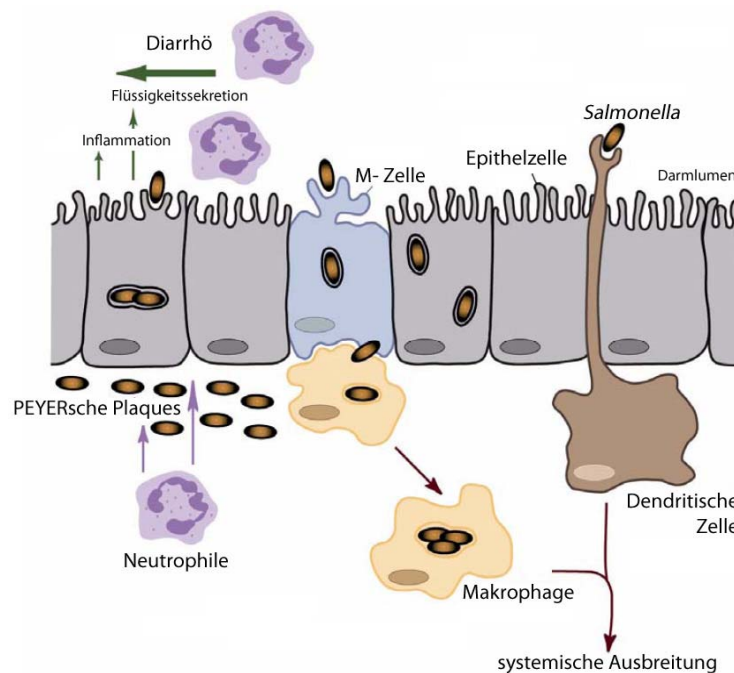


Abbildung 1.2: Pathogenese einer *Salmonella*-Infektion. Salmonellen dringen in das Darmepithel entweder durch aktive Invasion oder durch passive Aufnahme über M-Zellen oder dendritische Zellen ein. Die freigesetzten Bakterien lösen in den PEYERschen Plaques eine Entzündungsreaktion aus. Dadurch kommt es auch zur Rekrutierung von Neutrophilen und zur Flüssigkeitssekretion in das Darmmlumen, was zu Durchfall-Erkrankungen führt. Bakterien die von Fresszellen aufgenommen werden, können sich im Körper ausbreiten und systemische Infektionen verursachen (modifiziert nach Sansonetti, 2004 [76]).

Als Hauptziel der Salmonelleninvasion gelten die M-Zellen (*membranous epithelial cells*), die in den PEYERschen Plaques des Darmepithels lokalisiert sind (Abb. 1.2) [77]. M-Zellen können die Erreger phagozytieren, das aktive Eindringen in diese Zielzellen wird jedoch durch *Salmonella*-induzierte lokale und temporäre Umlagerungen der Aktinfilamente des Zytoskeletts erleichtert (*membrane ruffling*) [78]. Nach dem Durchbrechen der intestinalen

EINLEITUNG

Barriere werden die Erreger in die eigentlichen Wirtszellen aufgenommen. Dort liegen die Salmonellen in Membran-umhüllten Vesikeln im Zellinneren vor, den sogenannten *Salmonella containing vacuoles* (SCV). Diese SCV's bilden eine intrazelluläre Nische und werden für die Reifung und Replikation der Bakterien genutzt [79].

Die intrazelluläre Infektion der Wirtszellen wird von Fresszellen des Immunsystems, den Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten, registriert. Diese versuchen die Erreger durch Phagozytose zu eliminieren. Im Zuge der Erregerbekämpfung kommt es in den infizierten Zellen zur Ansäuerung des Phagosomens. Diese pH-Erniedrigung steigert jedoch die Stoffwechsel- und Teilungsaktivität der Salmonellen und ist für die SPI-2 Aktivierung notwendig. Bestimmte Effektorproteine der SPI-2 induzieren Apoptose in den Makrophagen, was wiederum eine längere Inflammation des Darmepithels zur Folge hat [80]. Zusätzlich kann die daraus resultierende Freisetzung der Salmonellen zu einer Reinfektion der Zellen des Wirtsgewebes führen. Gelangen die Erreger in die Lymphknoten können sie sich in der Milz und Leber manifestieren und weiter über die Blutgefäße zirkulieren, sodass sich die Infektion im gesamten Organismus ausbreitet und zum Krankheitsbild einer Sepsis oder Septikämie führt.

1.2.4 *Salmonella* Virulenzfaktoren

Der Unterschied zu kommensalen, apathogenen, enterobakteriellen Mikroorganismen liegt in der Fähigkeit der Salmonellen, sich mit Hilfe von Fimbrien und Pili an die Oberfläche von Darmepithelzellen anzuheften, die Integrität dieser Zielzellen durch die Modulation des Aktin-Zytoskeletts für eine Internalisation zu beeinflussen, die zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems zu stören und letztendlich, im Falle systemischer Vertreter, tiefer liegende Gewebe zu kolonisieren und sich systemisch im Wirt auszubreiten. Diese Fähigkeiten beruhen auf dem Erwerb von Virulenzfaktoren im Laufe der Evolution durch horizontalen Gentransfer [81].

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung zum Genus *Salmonella* war die Aufnahme der sogenannten *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1), welche bei *S. enterica* und *S. bongori* vorkommt. Dieses additiv erworbene Cluster von Virulenzfaktoren ist essentiell für die Invasion in die Epithelzellen und somit der Grundstein für die Virulenz der Salmonellen. *S. enterica* unterscheidet sich in erster Linie bezüglich des Erwerbs einer weiteren Pathogenitätsinsel, SPI-2, von *S. bongori*. Bislang sind mehr als 20 SPI's in *Salmonella*

EINLEITUNG

beschrieben worden, die in unterschiedlichen Phasen der Salmonellose von Bedeutung sind. Die Pathogenitätsinseln sind durch folgende Charakteristika definiert [82]: Sie sind diskrete DNA-Elemente, die in pathogenen Stämmen bestimmter Spezies vorkommen, in verwandten apathogenen Stämmen hingegen nicht. Pathogenitätsinseln kodieren für Virulenzfaktoren und Regulationsproteine. Ihr häufig unterschiedlicher GC-Gehalt weist darauf hin, dass die Pathogenitätsinseln über horizontalen Gentransfer erworben worden sind. Oft sind sie instabil und werden spontan eliminiert. Eine Instabilität der *Salmonella*-Pathogenitätsinseln ließ sich allerdings nicht zeigen [83]. Interessant ist, dass auf der SPI-1 und SPI-2 Gene lokalisiert sind, die unabhängig voneinander für zwei Typ-III-Sekretionssysteme kodieren.

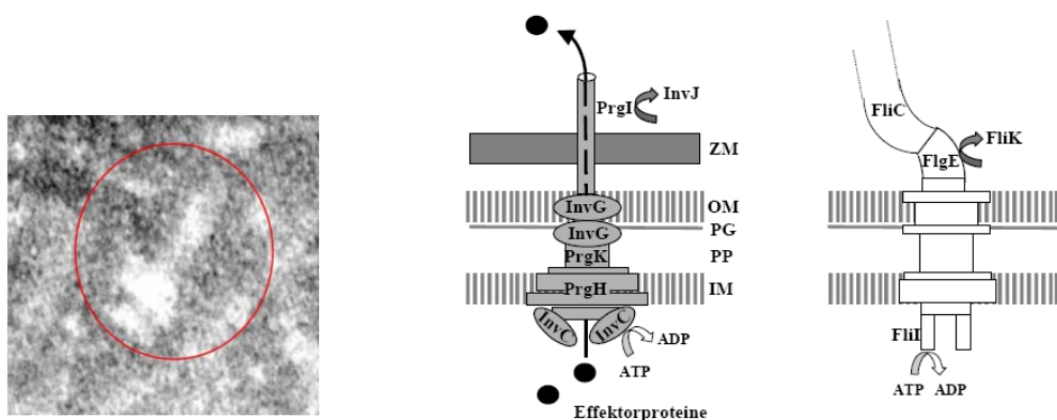


Abbildung 1.3: Der Typ-III-Translokationsapparat von *Salmonella* im Vergleich zum bakteriellen Flagellensystem. **Links:** Mittels Cäsiumchlorid-Zentrifugation aufgereinigter Typ-III-Sekretions-Apparat aus *S. Typhimurium* LT2, mit freundlicher Genehmigung von W. Streckel. **Rechts:** Die beiden Modelle wurden mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und biochemischen Analysen entworfen: der Typ-III-Sekretionsapparat von *Salmonella* spp. [84] und das Flagellensystem von *E. coli* [85]; ZM: eukaryotische Zellmembran; OM: äußere Membran; PG: Peptidoglykanschicht (Mureinsacculus); PP: Periplasmatischer Raum; IM: innere Membran).

Das Typ-III-Sekretionssystem ist ein Multiproteinkomplex, der aus mehr als 20 Proteinen aufgebaut ist und eine „molekulare Injektionsnadel“ ausbildet, durch die Effektorproteine in die Wirtszelle „injiziert“ werden [86]. Abbildung 1.3 zeigt den Typ-III-Translokationsapparat vergleichend zum Flagellensystem, denn strukturell finden sich zum Teil hohe Ähnlichkeiten [87]. So ähnelt die Architektur der Apparatkomponente in innerer und äußerer Membran der Struktur des sogenannten Basalkörpers der Flagellen [88].

Mit dem Typ-III-Sekretionssystem werden folgende Barrieren überwunden: innere Membran – periplasmatischer Raum – Mureinsacculus – äußere Membran – Membran der Wirtszelle. Somit können die diversen Virulenz-assoziierten Effektorproteine in das Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert werden, welche die Internalisierung, das Überleben und die Schädigung

EINLEITUNG

der Wirtszelle verursachen. In Tabelle 1.1 sind einige wichtige Effektorproteine und deren Funktion aufgelistet.

Tabelle 1.1: Auflistung relevanter SPI-1 sekretierter Effektorproteine. Sop = *Salmonella outer protein*; SptP = *Salmonella protein tyrosine phosphatase*; AvrA = *anti virulence protein A*, diese Bezeichnung ist jedoch irreführend, denn das Protein besitzt keine Antivirulenzfunktion, cs = *Centisomen*, chromosomaler Lokus.

Protein	Funktion	Größe	Lokus
SopA	IL-8 Kaskade, Darmentzündung	80 kDa	cs 44
SopB	Invasion, Inflammation, Flüssigkeitsaustritt ins Darmlumen, Darmentzündung	62 kDa	cs 20
SptP	Veränderung des Zellzytoskeletts	60 kDa	cs 63
SopD	Darmentzündung, Flüssigkeitsaustritt ins Darmlumen	36 kDa	cs 64
AvrA	Hemmung der IL-8 Produktion	32 kDa	cs 63
SopE	Veränderung des Zellzytoskeletts (<i>membrane-ruffling</i>)	29 kDa	cs 63
SopE2	Veränderung des Zellzytoskeletts (<i>membrane-ruffling</i>)	28 kDa	cs 40-42

SopE und SopB können Membranveränderungen der Wirtszelle einleiten und somit das Eindringen der Erreger erleichtern. Sie induzieren die Reorganisation des Aktinzytoskeletts über die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac. SopE und SopE2 stimulieren hierbei den GDP/ GTP-Austausch für die GTPasen, die eine entscheidende Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts spielen. Das Fehlen von SopE wird durch das Vorhandensein von SopE2 „kompensiert“. SopE2 scheint spezifisch für Cdc42 zu sein [89], wohingegen SopE ein GTP-Austauschfaktor für sowohl Rac als auch Cdc42 ist [78, 90]. Die Inositol-Polyphosphatase SopB beeinflusst die Invasion, vermutlich durch eine indirekte Aktivierung von Cdc42 [91, 92]. SopB ruft wie SopD zelluläre und metabolische Schädigungen hervor. So wird ein Flüssigkeitsaustritt ins Darmlumen über die Aktivierung der Chloridkanäle induziert, was zur Entstehung einer Diarrhö führt. SopA und SptP ändern metabolische Vorgänge. SptP ist an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach erfolgter Aufnahme der Salmonellen beteiligt, indem die Wirkung von Rac und Cdc42 beendet wird [93, 94]. An der Überwindung der angeborenen Immunabwehr sind besonders AvrA und SptP beteiligt. Vermutlich wurde AvrA als Adaptationsprotein erworben und verbessert die Anpassung der *S. enterica* Stämme an bestimmte Wirte [95]. Das AvrA Protein besitzt die Fähigkeit, die IL-8 Bildung zu hemmen und somit die Inflammation als wichtiges Signal der angeborenen Immunabwehrkaskade zu stören [96].

Die Verteilung dieser Virulenzgene im Genom zeigt, dass diese für den Invasionsprozess wichtigen Komponenten, unabhängig voneinander durch horizontalen Gentransfer erworben wurden [97]. So zeigten Mirolid *et al* (2001), dass auch einzelne Virulenzfaktoren mit Hilfe von Plasmiden und Bakteriophagen zwischen verschiedenen Spezies übertragen werden, wie

EINLEITUNG

im Falle des Effektors SopE [98]. Durch den Bakteriophagen SopEΦ kann das Virulenzgen *sopE* zwischen verschiedenen *Salmonella*-Stämmen bzw. Serovaren transfiziert werden und die Virulenz innerhalb der Gattung *Salmonella* durch horizontalen Gentransfer verändern [99]. Außerhalb der SPI-1 und SPI-2 sind weitere für den Infektionsprozess essentielle Virulenzgene an unterschiedlichen Positionen im Genom zu finden. So ist z. B. *sopA* bei Centisom 44, *sopB* auf der SPI-5, *sopD* auf einem kryptischen Phagen und *sopE2* auf einem lysogenen Phagen lokalisiert (Abb. 1.4).

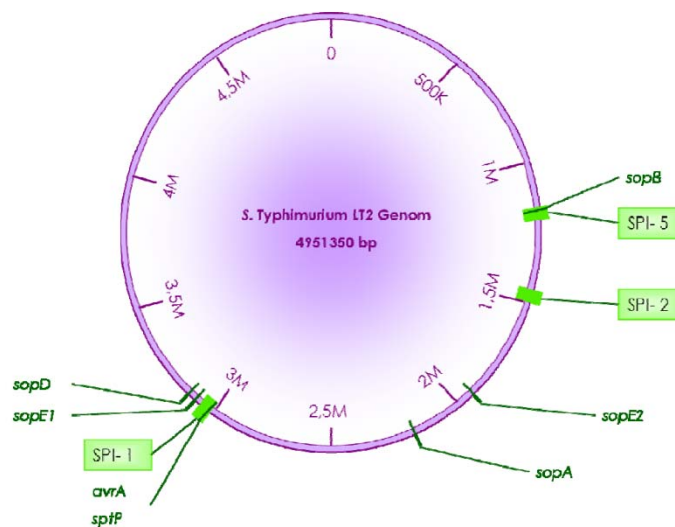


Abbildung 1.4: Organisation des Genoms pathogener Salmonellen am Beispiel des Stammes *S. Typhimurium* LT2 hinsichtlich verschiedener Virulenzfaktoren.

Abgesehen von den bereits aufgeführten Virulenzfaktoren, werden mit Salmonelleninfektionen weitere verschiedene potentielle Virulenzfaktoren in Verbindung gebracht. Diese sind Geißeln, Fimbrien, Enterotoxine [100], Cytotoxine, Hitzeschockproteine, Lipopolysaccharide (LPS) [101] und Siderophore [102].

Mehrere Studien unterschiedlicher Bakterien belegen aber auch, dass Phospholipasen als Virulenzfaktoren gelten und zeigen bereits deren Rolle in der Virulenz und Pathogenität in einer bakteriellen Infektion [103-109].

1.2.4.1 Phospholipasen

Phospholipasen sind eine Gruppe von Phospholipid-hydrolysierenden Enzymen. Sie sind in Mikroorganismen weit verbreitet und existieren in intrazellulärer und extrazellulärer Form. Die Phospholipide sind vor allem wichtige Bausteine aller Zellmembranen und bilden das

Grundgerüst der Biomembranen. Die Zerstörung der Phospholipide, durch mikrobielle Phospholipasen und die nachträgliche Änderung der Membranbestandteile führt zu Zellschäden und wird als wichtiger Virulenzmechanismus in der Infektion angesehen.

1.2.4.1.1 Eigenschaften und Klassifizierung von Phospholipasen

Phospholipasen sind eine Klasse von lipolytischen Enzymen, Acylhydrolasen und Phosphodiesterasen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Hydrolyse einer oder mehrerer Esterbindungen in Glycerophospholipiden. Alle Phospholipasen nutzen Phospholipide als Substrat, jedoch variiert der Wirkort auf das Phospholipid-Molekül, ihre Funktion, Wirkungsweise und ihre Regulation [110]. Je nach Ort des Geschehens, können Phospholipasen entsprechend ihrer Substratspezifität klassifiziert werden. Durch Anhänge der Buchstaben A, B, C und D werden sie in der Literatur unterschieden und die spezifische Zielbindung im Phospholipid-Molekül angegeben (Abb. 1.5). Beispielsweise hydrolysiert Phospholipase A1 (PLA₁) die Fettacyl esterbindung an der *sn*-1-Position der Glycerineinheit, die Phospholipase A2 (PLA₂) hingegen an der *sn*-2-Position der Glycerineinheit [110]. Phospholipase B (PLB) hydrolysiert die Bindung an beiden genannten Positionen.

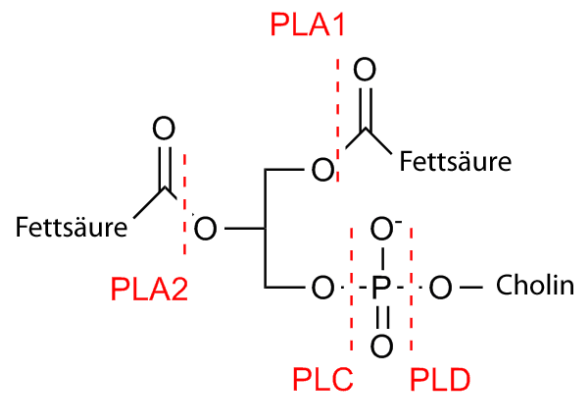


Abbildung 1.5: Trennstellen bei der Spaltung durch Phospholipasen. PLA₁ spaltet die Fettacyl esterbindung an der *sn*-1-Position der Glycerineinheit, die PLA₂ hingegen an der *sn*-2-Position. Die Phospholipase B spaltet im Phospholipid an beiden Positionen, *sn*-1-Position und *sn*-2-Position. PLC spaltet bei der ersten Phosphodiesterbindung und PLD bei der Zweiten [110]. Datei abgewandelt nach: Phospholipases 2.png, Quelle: en.wikipedia.

PLA₁ und PLA₂, sowie PLB sind Acylhydrolasen, die spezifisch die Fettsäurereste im Phospholipid abspalten. Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD) hingegen gehören zur Gruppe der Phosphodiesterasen. PLC greift bei der ersten Phosphodiesterbindung an und PLD an der zweiten.

EINLEITUNG

Eine weitere Einordnung der unterschiedlichen bakteriellen Enzyme erfolgt anhand homologer Proteinsequenzabschnitte. Bakterielle Esterasen und Lipasen werden entsprechend ihrer Aminosäuresequenzmotive in acht Familien unterteilt [111]. Alle Familien besitzen das Merkmal einer katalytischen Triade aus Ser-His-Asp/ Glu.

Die „wahren Lipasen“ gehören zu der ersten Familie und können weiter in sechs Unterfamilien eingeteilt werden. Die Mitglieder dieser Familie besitzen ein konserviertes Pentapeptid, das Gly-X-Ser-X-Gly-Motiv. Das umschlossene aktive Serin bildet mit Asp und His die typische katalytische Triade. Mitglieder der zweiten Familie werden auch als GDSL-Hydrolasen bezeichnet. Namensgebend ist das Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)]-Motiv, welches das aktive Serin enthält. Mitglieder der Familie III zeigen Homologie zu Plasmamaisformen der humanen PAF- (*platelet-activating factor*) Azetylhydrolase. Bakterielle Enzyme mit Aminosäuresequenzähnlichkeit zu humanen hormonsensitiven Lipasen (HSL) gehören zu der Familie IV und solche mit Ähnlichkeit zu verschiedenen nicht-lipolytischen Enzymen werden der Familie V zugeordnet. Die Enzyme der Familie VI sind eine Zusammenfassung von 23 – 26 kDa kleinen Esterasen, wohingegen Familie VII eher große Esterasen (55 kDa) gruppiert. Zur letzten Familie (VIII) werden Enzyme gezählt, die Homologien zu Klasse C β -Laktamasen aufweisen [111].

Eine weitere Gruppe bakterieller lipolytischer Enzyme bilden Patatin-ähnliche Proteine (PLP). Die Benennung PLP resultiert auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu einer eukaryotischen Phospholipase A, dem Patatin. Dieses als Speicherprotein der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) charakterisierte Protein hat aber auch enzymatische Aktivität und katalysiert u. a. die Spaltung von Fettsäuren aus Membranlipiden [112].

Patatin und PLP werden als eine neue Familie von lipolytischen Enzymen postuliert, denn sie besitzen eine katalytische Ser-Asp Diade, anstatt der oben angesprochenen für Lipidhydrolasen üblichen Triade aus Ser-His-Asp/ Glu [113-115].

Die homologen Proteinsequenzabschnitte von bakteriellen und eukaryotischen PLP lassen sich in vier konservierte Blöcke gliedern [113, 116]. In Block I befindet sich eine glyzinreiche Region mit einem konservierten Arginin- oder Lysinrest. Block II enthält das evolutionär konservierte Konsensusmotiv G-X-S-X-G [117] mit dem aktiven Serin im Zentrum [116]. In Block III und Block IV grenzen hoch konservierte Prolinreste an, in letzterem befindet sich zudem das aktive Aspartat, welches den zweiten Bestandteil der katalytischen Diade bildet [113].

1.2.4.1.2 Phospholipasen als bakterieller Virulenzfaktor

Mikrobielle Krankheitserreger nutzen eine Reihe von Strategien, um in die Wirtszelle einzudringen und Infektionen zu verursachen. Für eine Invasion in die Wirtszellen müssen die Mikroben zunächst die äußere Zellwand durchdringen, wodurch diese beschädigt wird. Das Eindringen in die Zielzelle wird durch physikalische oder enzymatische Mittel erreicht, so sind Phospholipasen und Proteinasen an der Membranmanipulation beteiligt [110]. Die Phospholipasen gelten daher auch als Pathogenitätsfaktoren, welche die Wirtszellen schädigen [118, 119]. Verschiedene Studien liefern Beispiele für bakterielle Phospholipasen und ihre Rolle in Virulenz und Pathogenität. Das α -Toxin von *Clostridium perfringens* beispielsweise ist eine Phospholipase C [103] und induziert die Expression von IL-8 in Endothelzellen [104]. *Pseudomonas aeruginosa* produziert neben Exoenzym U (ExoU), eine Phospholipase, welche die Membran der Wirtszellen schädigt, weitere Phospholipasen, wie PLC (*plcH*) die auf der Oberfläche von Alveolar-Zellen die Phospholipide degradiert [105, 120]. *Listeria monocytogenes* besitzt zwei PLC Proteine, die wichtig für die Pathogenität sind [121] und *Mycobacterium tuberculosis* verfügt über vier für die Virulenz relevante Phospholipasen [122]. Phospholipasen A regulieren die konstante Umsetzung von Membranphospholipiden in *E. coli* [123] und *S. Typhimurium* [106]. *Rickettsia* spp. „entkommen“ einem Phagosomeneinschluss durch Phospholipase A-vermittelte Membranläsionen [124].

Einige *Salmonella* Spezies sind bekannt für ihre von Phospholipiden vermittelte lipolytische Aktivität. Ihre hydrolytische Aktivität an zellulären Membranen resultiert in strukturellen und funktionellen Änderungen. Während die Phospholipase A bei *Salmonella* Newport, sowohl intra- wie auch extrazellulär vorhanden ist, konnte die Aktivität des Enzyms bei *S. Typhimurium* nur intrazellulär gezeigt werden [125]. Neunzig *Salmonella* Stämme wurden aus Mensch, Umwelt und Geflügel isoliert und deren Phospholipase A Aktivität getestet, dabei wurde bei 17% der Stämme Phospholipaseproduktion nachgewiesen. Die Mehrheit der Phospholipase A produzierenden *Salmonella* Stämme stammte aus klinischen Isolaten, wobei keine Serotyp-Korrelation festgestellt und die Phospholipase-kodierenden Gene nicht identifiziert wurden. [126]. Eine Untersuchung der Virulenzeigenschaften dieser Stämme zeigte die Möglichkeit, dass das Enzym zwar nicht *per se* ein Virulenzfaktor ist aber vielleicht als Helfertoxin auf Zielzellmembranen einwirkt. Baloda *et al* (1983) haben berichtet, dass zytotoxische und zytotonische Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Salmonellosen spielen [127].

1.2.4.1.3 Patatin-ähnliche Phospholipasen als Virulenzfaktor

Proteine der Patatin-Familie stellen lipolytische Enzyme dar. Das Eponym dieser Proteinfamilie, das Kartoffel-Patatin, besitzt sowohl Acyltransferase- [128], Esterase- [129] als auch Acylhydrolaseaktivität [130], letztere beinhaltet Phospholipaseaktivität [116].

Banerji und Flieger konnten bereits 2004 durch Sequenzvergleiche zeigen, dass neben Patatin auch viele bakterielle Patatin-ähnliche Proteine (PLP) vier konservierte Domänen enthalten. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Patatin-ähnliche Proteine in verschiedenen Eukaryoten und Prokaryoten vorkommen [109], sowohl in gramnegativen (*Brucella* spp., *Rickettsia* spp., *Yersinia pestis*), wie auch in grampositiven (*Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*) Spezies. Interessanterweise werden bakterielle PLP häufig von Symbionten und Pathogenen kodiert, deren Lebenszyklus mit engem Kontakt zu Eukaryoten einhergeht. Diese Effektoren könnten demnach wichtig für die Pathogen-Wirt-Interaktion sein. Die erste charakterisierte Patatin-ähnliche bakterielle Hydrolase ist das ExoU von *Pseudomonas aeruginosa*. Das gramnegative Pathogen löst neben dem häufigen Erscheinungsbild der Pneumonien bei zystischer Fibrose, die vor allem bei immunsupprimierten und AIDS-Patienten besonders schwerwiegend sind, auch Harnwegsinfekte, Enterokolitis, Meningitis oder Infektionen auf Brandwunden aus. ExoU ist ein Typ-III-sekretiertes Zytotoxin und gilt als Virulenzfaktor mit Lipase und Phospholipase A Aktivität [131]. Es schädigt die Membranen der Wirtszellen und trägt somit entscheidend zur Pathogenese des bakteriellen Erregers bei. ExoU ist nur in einigen klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten vorhanden und spielt im Mausmodell, durch Schädigung des Lungenepithels, eine entscheidende Rolle in Atemwegsinfektionen [132, 133]. Eine Studie mit dem Amöbenmodell *Dictyostelium discoideum* beschreibt, dass ExoU für einen Teil der Virulenz verantwortlich ist [134]. Auch Studien mit der Wachsmotte *Galleria mellonella* demonstrieren eine Rolle in der Virulenz in diesem System [135]. Die Pathogenität, der Patatin-ähnlichen bakteriellen Hydrolase ExoU ist in vielen Zellkulturmodellen und im Mausmodell beschrieben [133, 136-138].

Durch Sequenzvergleiche ausgewählter bakterieller Patatin-ähnlicher Proteine mit konservierten Patatindomänen konnte die Zugehörigkeit einer putativen Phosphoesterase YchK von *Salmonella Typhimurium* str. LT2 zu der Gruppe bakterieller Phospholipasen gezeigt werden [113]. Die Erforschung der *S. Typhimurium* Patatin-ähnlichen Proteine hinsichtlich ihrer Charakterisierung und ihre Rolle als putative Virulenzfaktoren ist Ziel dieser Arbeit.

1.3 Ziel der Arbeit

Der Untersuchungsschwerpunkt innerhalb der vorliegenden Arbeit galt der Identifizierung und Charakterisierung neuer *Salmonella* Typhimurium Virulenzgene mit Bedeutung für die Wirtszellinfektion, um zum Verständnis der Virulenz des Krankheitserregers beizutragen. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit ein für *Legionella* etabliertes Amöben-Screening-Modell genutzt. Hierbei bilden *L. pneumophila* Mutanten, die eine reduzierte Fähigkeit zur Kolonisation von Amöben besitzen, in der Interaktion mit den Einzellern auf Agarplatten einen als Scattermorphologie beschriebenen Koloniephänotyp aus. Solche avirulenten Klone können, aufgrund ihres Defekts, von Amöben als Nahrungsquelle genutzt werden. Somit werden diese Klone als sensitiv in der Interaktion mit *Acanthamoeba castellanii* beschrieben. Analog wurden zwei Tn5-mutagenisierte *Salmonella* Klonbanken auf unterschiedliche Sensitivität gegenüber Amöben im Agar-basierten Screen untersucht. Im Anschluss sollten die hierbei isolierten putativ avirulenten *Salmonella* Klone auf ihre quantitative Infektionsfähigkeit, sowohl im Amöbeninfektionsmodell, wie auch in phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zelllinien untersucht werden, wodurch die Identifizierung bekannter und potentieller Virulenzfaktoren ermöglicht werden sollte.

Da mehrere Studien in anderen gramnegativen Bakterien, wie *Legionella* und *Pseudomonas* bereits Patatin-ähnliche Proteine als Virulenzfaktoren beschreiben, sollten im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit *S. Typhimurium* Patatin-ähnliche Proteine charakterisiert und bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität sowie möglichen Rolle und Wirkmechanismus für die Infektion von Wirtszellen untersucht werden. Dazu sollten Patatin-ähnliche Protein-Mutanten generiert und in etablierten Zellkultursystemen untersucht werden. Die lipolytische Aktivität sollte durch rekombinante Expression und Aufreinigung der Proteine analysiert werden.

2. Material

2.1 Laborausstattung

Tabelle M 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten	Tecan Sunrise	Tecan
Brutschränke	a) B20	Heraeus
	b) HeraCell 240	Heraeus
Drehrad	a) neoLab-Rotator 2-1175	neoLab
	b) Roler Drum	New Brunswick Scientific
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Life Technologies
FPLC	ÄKTAprime	Amersham Bioscience
Gelelektrophorese-Apparaturen	a) Gelkammer (Mini) SubCell GT	Bio-Rad
	b) Spannungsgerät PowerPack 300	Bio-Rad
	c) Mini Protean® 3	Bio-Rad
Heizschüttler	a) Thermomixer Comfort	Eppendorf
	b) Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubatoren	a) InnovaTM 4230	New Brunswick Scientific
	b) InnovaTM 43	New Brunswick Scientific
Kamera	EOS 450D Spiegelreflexkamera	Canon
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosis
Mikroskope	a) Axiovert 200M	Carl Zeiss Jena
	b) IMT	Olympus
	c) Ti-E inverses Forschungsmikroskop	Nikon
Hochdruckhomogenisator	Emulsiflex C 3	Avestin Europe
pH-Elektrode	Toledo MP225 pH Meter	Mettler
PCR-Cycler	a) Thermocycler T-Gradient	Biometra
	b) FlexCycler	Analytik Jena
	c) 7500 Real-time PCR System	Applied Biosystems
Plattiergerät	Whitley Spiral Plater	Meinrup DWS
Semidry-Elektroblotter	Bio-Rad-SemiDry-Blotter	Bio-Rad
Sterilbank	Herasafe	Heraeus
Tisch-Schüttler	Certomat® U/HK	B. Braun Biotech International
UV/VIS Spektrophotometer	a) NanoDrop® ND-1000	NanoDrop
	b) NanoPhotometer	Implen
	c) DU®520 Spectrophotometer	Beckman Coulter
UV-Transluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Vortex Mixer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Waagen	a) CP64	Sartorius AG
	b) 1212 MP	Sartorius AG
Zentrifugen	a) Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
	b) Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge	Du Pont Instruments
	c) Labofuge400	Heraeus
	d) Kühlzentrifuge 5810R	
	Rotoren: A-4-62; F-34-6-38	Eppendorf
	e) Avanti™ Centrifuge J-25	BeckmanCoulter

2.2 Spezielle Materialien

Tabelle M 2.2: Auflistung spezieller Materialien

Materialbezeichnung	Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Cryo-Gefäße	Zur Lagerung von Glycerolgefrierkulturen	Roth	E309.1
Deckgläschen	12mm Deckgläschen	Roth	P231.2
Elektroporationsküvetten	Küvetten für den CellPorator	Whatman	11608-031
Filter	a) Rotilabo®Spritzenfilter 13mm	Roth	T056.1
	b) FP30/0.3 CA-S Sterilfilter	Schleicher & Schuell	10462200

MATERIAL

Materialbezeichnung	Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Filterpapier	Whatman GB 005 Gel Blotting Paper	Whatman	10426994
Glasröhrchen	Gefäß zur Bakterienkultivierung	Schott	231721197
Kanüle	26-gauge Sterican Gr.17	B.Braun	(RKI Lager)
Küvetten	Einmal-Küvetten aus PMMA	Roth	P95.1
Mikrotiterplatten	96-well, F-Form	Anicrin	3911925
Nickel Sepharose Säulchen	His Trap HP 1ml	GE/ Amersham	17-5247-01
Objektträger	Superfrost geschnitten	Roth	1879.1
Transfer-Membran	Immobilon-P Transfer Membran	Immobilon	IPVH00010
Reaktionsgefäße	a) 1,5ml Safe-Lock Tubes /	Eppendorf	0030.120.086/
	2ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf	0030 120.094
	b) PCR Tubes	Greiner bio-one	683201
	c) 15/ 50ml Tubes	Greiner bio-one	188271/227270
Serologische Pipetten	5/ 10/ 25ml, steril, BD Falcon	BD Bioscience	357530/356535
Spritze (Feindosierung)	Omnifix®-F ohne Kanüle	B.Braun	9161406V
Zellkulturflaschen	a) 25 cm ²	Nunc	a) 156367
	b) 75 cm ²	Nunc	b) 178891
	c) 175 cm ²	Nunc	c) 159910
Zellkulturplatten	24-well Cellstar	Greiner bio-one	662160
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, improved	Roth	T729.1

2.3 Chemikalien

Tabelle M 2.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalienbezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	Roth	7328.2
Accutase	PAA	L11-007
Acrylamid-Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth	3029.2
Agar	Merck	101618
Agarose	Promega	V3125
Alamar Blue	Biosource	DAL-1025
Ammoniumpersulfat (APS)	Amresco	0486
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich	A9518
BCIP/ NBT Substrat	SigmaFast™	B5655
Bromphenolblau/ Xylencyanol	Sigma-Aldrich	B3269
BSA (Rinderserum Albumin)	PAA	K41-001
Chloroform	Merck	102445
Coomassie, kolloidal (Roti®-Blue)	Roth	A152.1
DMEM	PAA	E15-843
dNTP, Nukleotid Mix 10mM	Bioline	BIO-39043
ε-Aminocapronsäure	BioChemica	A2266,0100
Ethanol, zur Analyse	Merck	100983
Ethidiumbromid	Merck	111608
FKS (Fötales Kälberserum)	PAA	A-15-043
Glyzerol 86%	Roth	7533.3
Kanamycinmonosulfat	Sigma-Aldrich	K-1377
Methanol	Roth	T909.1
Mucosol	Brand	60434
Natriumchlorid	Roth	3957.2
Natrium EDTA (Triplex III)	Merck	108418
Natriumhydroxid	Roth	6771.3
PeqGOLD RNA Pure™	Peq-Lab	30-1020
Paraformaldehyd	Merck	8.187515.0100
Phenol	Roth	A156.2
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich	79346
ProLong Gold Antifade mit DAPI	Invitrogen	P36931
ProLong Gold Antifade ohne DAPI	Invitrogen	P36931
2-Propanol, Isopropanol	Roth	6752.4
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	Roth	3060.1
RPMI 1640 Pulver/ Flüssig	Invitrogen/ PMA	51800-043/ E15-840
Saponin	Merck	4185.1
Skim Milk Powder	Fluka	70166

MATERIAL

Chemikalienbezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Sodium-Dodezylsulfat (SDS)	Roth	CN30.2
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth	2367.3
Trichloressigsäure (TCA)	Roth	8789.2
Tris Base	Sigma-Aldrich	T8760-2
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8,787
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin	Sigma-Aldrich	L-8003
Trypsin-EDTA	PAA	L11-004
Tween20	Merck	817072
Tween80	SERVA	37475
X-Gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside	Diagnostic Chemicals Ltd.	1161

2.4 Lipidsubstrate

Tabelle M 2.4: Auflistung der Lipidsubstrate

Kürzel	Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids	850355P
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-1-Glycerol	Avanti Polar Lipids	840455P
MPLPG	1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phospho-Glycerol	Avanti Polar Lipids	858122P
MPLPC	1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids	855675P

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle M 2.5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Bestandteile	Menge/ Konzentration
PBS Puffer (pH 7,2) zu 1000ml H ₂ O bidest	KCl	0,2 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	NaCl	8 g
Puffer für die DNA-Gelelektrophorese		
50×TAE Puffer (pH 8,0)	Tris Base	2,0 M
	Eisessig	1,0 M
	Na ₂ EDTA	0,1 M
DNA Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	30 %
Puffer für die Protein-Gelelektrophorese und Western Blot		
Laemmli Probenpuffer	Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,001 %
	Glycerin	10 %
	SDS (10%ig)	2 %
	Tris pH 6.8	62,5 mM
AnodenPuffer I	Methanol	20 %
Anodenpuffer II	Tris	0,3 M
	Methanol	20 %
Kathodenpuffer	Tris	25 M
	ϵ -Aminocaprinsäure	40 mM
	SDS	0,01 %
5 % Blocking Solution	Tris	25 mM
	Milchpulver	1 g
	TBS	20 ml

MATERIAL

SDS Trenngel	(10 %ig)	(12,5 %ig)	SDS Sammelgel	(4%ig)
Acrylamid/Bisacrylamid	3,3 ml	4,2 ml	Acrylamid/Bisacrylamid	0,6 ml
1,5M Tris Base (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)	1,25 ml
H ₂ O	4,15 ml	3,1 ml	H ₂ O	3 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	5 µl

2.6 Enzyme, Standards, Antikörper

Tabelle M 2.6: Auflistung verwendeter Enzyme, Standards und Antikörper

Enzymbezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Antarctic Phosphatase	NEB	M0289S
Antarctic Phosphatase Puffer	NEB	B0289S
Lysozym	Sigma-Aldrich	L-7651
PCR-Sequenzierungs-Polymerase (BigDye 3.1)	Applied Biosystems	4337035
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas	EP0501
Proteinase K	Omega Bio-Tek	D3350-02 (Kit)
Restriktionsendonukleasen	NEB	s. Tabelle M 2.7
RNase OUT™ Ribonuklease (RNase) Inhibitor	Invitrogen	10777019
T4 Polynukleotid Kinase	NEB	M0201S
T4 Polynukleotid Kinase Puffer	NEB	B0201S
T4 DNA Ligase	NEB	M0202
<i>Taq</i> DNA Polymerase	NEB	M0267

Standards für Elektrophoresen			
Standard	Bereich	Hersteller	Artikelnummer
Gene Ruler DNA Ladder Mix	0,1 - 10 kb	Fermentas	SM0331
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	10 - 200 kDa	Fermentas	SM0661
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10 - 170 kDa	Fermentas	SM0671
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10 - 170 kDa	Fermentas	26616
Amersham™ Low Range Rainbow Molecular Weight Marker	3,5 kDa - 38 kDa	GE Healthcare Biosciences	RPN 755
Amersham™ High Range Rainbow Molecular Weight Marker	12 kDa - 225 kDa	GE Healthcare Biosciences	RPN 756

Primärer Antikörper				
Bezeichnung/ Verdünnung	Spender	Konjugat	Hersteller	Artikelnummer
Anti- <i>Salmonella</i> LPS O-1, 4, 5, 12/ 1:400	Kaninchen	-	BD Diagnostics	229481

sekundärer Antikörper				
Bezeichnung/ Verdünnung	Spender	Konjugat	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Kaninchen IgG/ 1:200	Ziege	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11008
Anti-Kaninchen IgG/ 1:200	Esel	Alexa Fluor 594	Invitrogen	A21207

Tabelle M 2.7: Auflistung verwendeter Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Puffer	Hersteller	Artikelnummer
DpnI	NEB 4	NEB	R0176L
EcoRV	NEB 3	NEB	R0195L
Hind III	NEB 2	NEB	R0104L
Pst I	NEB 3	NEB	R0140L
Sph I	NEB 2	NEB	R0182L
XbaI	NEB 4	NEB	R0145L
XhoI	NEB 4	NEB	R0146L

MATERIAL

Tabelle M 2.8: Auflistung verwendeter Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spender	Verdünnung	Hersteller	Referenz
Anti-His	Maus	1:3000	SIGMA	-
Anti-His	Maus	1:3000	GE	-
Anti-mouse hrp	Ziege	1:10000	GE	-
Anti-rabbit IgG Alkalische Phosphatase	Ziege	1:2000	Southern Biotech	-
Anti- <i>Salmonella</i> -AvrA IgG	Kaninchen	1:10000	RKI	Ben-Barak <i>et al.</i> , 2006 [139]
Anti- <i>Salmonella</i> -SptP IgG	Kaninchen	1:20000	RKI	Faber, 2007 [140]
Anti- <i>Salmonella</i> -SopA IgG	Kaninchen	1:10000	RKI	Wille, 2007 [141]
Anti- <i>Salmonella</i> -SopB IgG	Kaninchen	1:10000	RKI	Wolf, 2004 [142]
Anti- <i>Salmonella</i> -SopD IgG	Kaninchen	1:10000	RKI	Streckel <i>et al.</i> , 2004 [143]
Anti- <i>Salmonella</i> -SopE/ SopE2 IgG	Kaninchen	1:40000	ETH Zürich	Prof. Dr. Hardt

2.7 Kits

Tabelle M 2.9: Auflistung der verwendeten Analyse-Kits

Produktbezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
ECL Western Reagents Kit	Amersham	34075
NEFA C Kit	Wako	994-75409
NEFA-HR (2) R1 Set	Wako	434-91795
NEFA-HR (2) R2 Set	Wako	436-91995
pBAD TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen	K4300-01
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen	210212
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
QIAprep Spin Mini Prep	Qiagen	27106
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106
QuickChange Site-Directed Mutagenese Kit	Stratagene	200518
Wizard Plus Minipreps	Promega	A1460
Wizard SV Gel und PCR cleanup system	Promega	A9282

2.8 Plasmide

Tabelle M 2.10: Auflistung der erworbenen Plasmide

Plasmid	AB- Resistenz	Hersteller/ Artikelnummer	Eigenschaften/ Referenz
pBAD-TOPO	Amp	Invitrogen/ K4202-01	-
pBlueskript II SK (+)	Amp	Stratagene/ 212205	-
pCP20	Amp, Cm	*	Cherepanov & Wackernagel, 1995 [144]
pFPV25.1	Amp	*	Valdivia & Falkow, 1996 [145]
pKD4	Amp	*	Datsenko & Wanner, 2000 [146]
pKD46	Amp	*	Datsenko & Wanner, 2000 [146]
pMALc2x	Amp	NEB/ ER2272	
pWSK29	Amp	*	Wang & Kushner, 1991 [147]
pWRG356	Amp	* Dr. R. Gerlach (RKI)	-

* Die Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Roman Gerlach (RKI, Außenstelle Wernigerode) zur Verfügung gestellt.

MATERIAL

Tabelle M 2.11: Auflistung der in dieser Arbeit erzeugten Plasmide

Plasmid*	Konstrukt	Größe des Inserts (bp)	Tags, Lokalisation	Amplifizierungsprimer
pKJ 1	pBlueskript II SK (+) + Pro- <i>STM2901</i>	868	-	1946/ 1945
pKJ 2	pWSK29 + Pro- <i>STM2901</i>	868	-	-
pKJ 3	pBlueskript II SK (+) + Pro- <i>STM0014</i>	1319	-	1943/ 1944
pKJ 4	pMALc2x + <i>yjjU</i>	1074	MBP, N-terminal	1691/ 1690
pKJ 6	pBAD-TOPO + <i>yjjU</i>	1074	V5/ 6×His, C-terminal	1689/ 1695
pKJ6-S	pBAD-TOPO + <i>yjjU</i> ^{S61A}	1074	V5/ 6×His, C-terminal	1835/ 1836
pKJ 7	pBAD-TOPO + <i>ychK</i>	906	V5/ 6×His, C-terminal	1688/ 1694
pKJ7-S	pBAD-TOPO + <i>ychK</i> ^{S41A}	906	V5/ 6×His, C-terminal	1833/ 1834
pKJ8	pBlueskript II SK (+) + Pro- <i>yjjU</i>	1338	-	1934/ 1935
pKJ9	pWSK29 + Pro- <i>yjjU</i>	1338	-	-
pKJ10	pBlueskript II SK (+) + Pro- <i>ychK</i>	1170	-	1955/ 1956
pKJ11	pWSK29 + Pro- <i>ychK</i>	1170	-	-

* Alle erzeugten Plasmide tragen ein Amp-Resistenzgen. Pro = Promotorbereich des Gens.

2.9 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, soweit nicht anders angegeben, in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen. Die DNA wurde jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Volumen Aqua bidest aufgenommen, sodass sie in einer Konzentration von 50pmol/ µl vorlagen.

Tabelle M 2.12: Auflistung verwendeter Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Primer	Tm [°C]	Sequenz	Anwendung
KAN-2 FP-1	72	61,3	5' ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC 3'	Tn5-Insertion
KAN-2 RP-1	73	58,1	5' GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG 3'	Tn5-Insertion
Inv1-EZTN (F)	378	59,7	5' ATGGCTCATAACACCCCTTGTATTA 3'	Tn5-Insertion
Inv2-EZTN (R)	379	59,7	5' GAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCA 3'	Tn5-Insertion
allD_fw	1286	53,2	5' ATATATCCGGGAGGGTAAAT 3'	Verifizierung
allD_rv	1287	54,5	5' AGCCAGGGCAATGTTTCTT 3'	Verifizierung
fdrA_fw	1353	50,2	5' ATGATCCACGCCTTTATTA 3'	Verifizierung
fdrA_rv	1354	52,8	5' TTATTGCAAACGTTCTAACAGA 3'	Verifizierung
glgS_fw	1343	49,1	5' ATGCTGATGAACAACAATAA 3'	Verifizierung
glgS_rv	1344	51,7	5' TTAGTGTCTAATTCTAACCTTT 3'	Verifizierung
livJ_fw	1357	54,7	5' ATGAAGGGTAAAACGTTATTGG 3'	Verifizierung
livJ_rv	1358	52,8	5' TCACTAGCGTCTGCTCG 3'	Verifizierung
lpfE_fw	1385	54,5	5' CTTTGATGCCAGCGTGTTT 3'	Verifizierung
lpfE_rv	1386	58,2	5' ACCGTCGCATTCGCTGTG 3'	Verifizierung
+mutH+_fw	1401	54,7	5' ATGTCCGCTCTTTGTCCGCTACT 3'	Verifizierung
+mutH+_rv	1402	53,7	5' GCGGTAGCGTCAAAATAGG 3'	Verifizierung
KJ_LT2cl30_fw	1651	57,3	5' AGA TGG CTG GCA AGT CTG TT 3'	Verifizierung
KJ_LT2cl30_rv	1652	59,4	5' CTG GAA GGG GAA GTG GAA CT 3'	Verifizierung
KJ_LT2cl17_fw	1627	55,3	5' AAAAGAGCATTAAGTTGGGGATT 3'	Verifizierung
KJ_LT2cl17_rv	1628	51,2	5' TTTTGCGCATATTCCAATG 3'	Verifizierung
KJ_LT2:cl.16_fw	1629	55,3	5' ATTGCCAAATCTGGCTCAAC 3'	Verifizierung
KJ_LT2:cl.16_rv	1630	55,3	5' TCTTTATGCCGGAAGCAGTT 3'	Verifizierung
pilKL_fw	1468	53,2	5' TCTTATTTCAAGTGGTCTCTC 3'	Verifizierung
pilKL_rv	1469	56,7	5' AAGGTAACGGTCGGGATTC 3'	Verifizierung
purD_fw	1284	51,4	5' CGAAAATCGCTGGCATT 3'	Verifizierung
purD_rv	1285	55,3	5' TTGCTGACGGGAGAAATACAT 3'	Verifizierung
selD_fw	1480	56,7	5' ATGAGCGAGCAAGCCATTC 3'	Verifizierung
selD_rv	1481	58,8	5' GCCTGCGCGGTACTGTTTT 3'	Verifizierung

MATERIAL

Primerbezeichnung	Primer	Tm [°C]	Sequenz	Anwendung
STM0014_fw	1361	59,4	5' GGGATCGAAAGGTGCCAACA 3'	Verifizierung
STM0014_rv	1362	59,8	5' TAGCGACGGAAGGAGGAAAAGT 3'	Verifizierung
STM1129_fw	1383	56	5' CCAGGCTGGAACAAAGTG 3'	Verifizierung
STM1129_rv	1384	53,7	5' AGCGTTTTACTGCGTGAC 3'	Verifizierung
STM2901_fw	1379	53,2	5' ATGGATACGACAGAAGAACT 3'	Verifizierung
STM2901_rv	1380	58,4	5' AGGGCGTGCTATTAGGTTGTAT 3'	Verifizierung
STM3501_fw	1470	57,3	5' CAGAATCGACCGTTAGTGGGA 3'	Verifizierung
STM3501_rv	1471	57,9	5' CATCTCCATTGGCATTTCTCTG 3'	Verifizierung
STM3601_fw	1462	58,8	5' TATGGCGCAGCCTACCTAC 3'	Verifizierung
STM3601_rv	1463	48	5' TTAATATTCCACTTTCCAC 3'	Verifizierung
1_STM4419_fw	1650	57,3	5' TAAACTGGGGCGTAAACCTG 3'	Verifizierung
1_STM4419_rv	1649	55,3	5' AAACAGGATGCCAAAGATGG 3'	Verifizierung
STM4575_fw	1391	50,2	5' TTATTAATAGCGACCTCTG 3'	Verifizierung
STM4575_rv	1392	54,5	5' CATCAAGCGTGGTGTATC 3'	Verifizierung
NewSTM4595_fw	1373	49	5' ATGTTTAATAAGAAAATAATCATC 3'	Verifizierung
STM4595_rv	1374	49,1	5' TTAATGATACGAAACGGT 3'	Verifizierung
traN_fw	1359	54,7	5' ATGAAACGTATGTTACCTCTGT 3'	Verifizierung
traN_rv	1360	64,4	5' TTATTTCCCGGCTGCTGAGTTG 3'	Verifizierung
udg_fw	1351	55,2	5' CGGGACGGGTATGTTG 3'	Verifizierung
udg_rv	1352	48	5' TTAATCACTACCGAAAAGA 3'	Verifizierung
MWG 260 (<i>gyrA</i>)	1951	53,5	5' AGCTCCTATCTGGATTATGCGAT 3'	RT-PCR
MWG 261 (<i>gyrA</i>)	1952	51,8	5' CGATTACGTCACCAACGACA 3'	RT-PCR
NewydeD_fw	1371	57,6	5' AACATACCATAACGCAGGATTTTG 3'	Verifizierung
NewydeD_rv	1372	59,8	5' CCTGCCGGGTCTGTTACTTAT 3'	Verifizierung
ycjE_fw	1369	50,1	5' TGCAAACATATAAAAACCTGA 3'	Verifizierung
ycjE_rv	1370	54,5	5' GTAAAAACGATGCTGGAACC 3'	Verifizierung
ydhJ_fw	1345	61	5' ATGTCTGGGCCTCGTTTACTGAT 3'	Verifizierung
ydhJ_rv	1346	62,1	5' TTACCGCTGTCCAATGGCTACG 3'	Verifizierung
ydiR_fw	1460	52	5' ATTTAGCTAACGTATGGGTAT 3'	Verifizierung
ydiR_rv	1461	58,2	5' CCCGTCGAGGAGGTCAAT 3'	Verifizierung
yebB_fw	1458	43,7	5' ATGAAAAAACATTATTCTG 3'	Verifizierung
yebB_rv	1459	56	5' TCATTCTCCCTCAGCCTC 3'	Verifizierung
1-clone 22_fw	1637	57,3	5' GATCCGACGCTGGTTGTAAT 3'	Verifizierung
1-clone22_rv	1638	57,3	5' AGCCATCAGCTTCATGTGTG 3'	Verifizierung
1_yfeD_fw	1647	56,7	5' CCAGACAAACCGTCAATCG 3'	Verifizierung
1_yfeD_rv	1648	57,3	5' CCTAAACGCGTCAGAAATCC 3'	Verifizierung
1_yfiN_fw	1655	59,4	5' GGCAGTGCTGACAGGATGTA 3'	Verifizierung
1_yfiN_rv	1656	57,3	5' CTACCACCGAATTCCGCTAA 3'	Verifizierung
1_yigL_fw	1639	57,3	5' ATTTAGATGGCAGCTGCTC 3'	Verifizierung
1_yigL_rv	1643	55,3	5' AGAAAAGATCGCGCAGGTAA 3'	Verifizierung
1_STM4424.S_fw	1395	54	5' TGATGATATTCTGAGATTGG 3'	Verifizierung
1_STM4424.S_rv	1396	67,4	5' GCCGCTGCGCCCTACCC 3'	Verifizierung
1_clone13_fw	1643	57,3	5' CAACAATCTGTCGGGTGCTA 3'	Verifizierung
1_clone13_rv	1644	57,3	5' AGTAAGGCGCTGATGCAGAT 3'	Verifizierung
yihP_fw	1377	64,4	5' ATCATCGAATCCGGCAACCCTACG 3'	Verifizierung
yihP_rv	1378	62,4	5' CGTAGTTTCCGGGCTCAATCT 3'	Verifizierung
1-yijC_fw	1653	55,3	5' GGTGTATAGAGCGCAACAAAA 3'	Verifizierung
1-yijC_rv	1654	53,2	5' AATCATGCGCAGTTGCAATA 3'	Verifizierung
ynaIJ_fw	1482	55,9	5' ACATAAAAAGTAAACCGCTGAGAT 3'	Verifizierung
ynaIJ_rv	1483	60,6	5' AGAATACGGGTACTGGTGACATC 3'	Verifizierung
yraM_rv	1635	57,3	5' TCCATTTCCAGACGGAAGTC 3'	Verifizierung
yraM_fw	1636	57,3	5' CGTACCATCCAGCAAGGTTT 3'	Verifizierung
pepN_fw	1365	62,7	5' CACAACAGCCACAAGCCAAATACC 3'	Verifizierung
pepN_rv	1366	53,2	5' ACGCTTAGTTATCTTCTCG 3'	Verifizierung
STM0438_fw	1347	34	5' TATCGATTCTGAA 3'	Verifizierung
STM0438_rv	1348	53,7	5' GTGGATATTCCGCAAGCA 3'	Verifizierung
narG2_fw	1389	62,7	5' GATCCAGCCGCCTTTCCATTTTTC 3'	Verifizierung
narG2_rv	1390	50,1	5' ATATAAATAAAACTCCTCCTC 3'	Verifizierung
glpK_fw	1367	38,3	5' ATGACTGAAAAAAATA 3'	Verifizierung
glpK_rv	1368	51,4	5' TTAATTGTCTGTCTCTTC 3'	Verifizierung
1_STM4195_fw	1641	57,3	5' CTACTGGGTGGACGTCTGT 3'	Verifizierung
1_STM4195_rv	1642	61,4	5' GCAGGGATTAAACCGTCAGA 3'	Verifizierung
EcoRV_STM2901_fw	1946	65,3	5' CAGGATATCTTGGCCATTTGTCTCTTACG 3'	Klonierung
STM2901_XbaI_rv	1945	65,3	5' CAGTCTAGAATCGCCTGGAGCTTCAAATA 3'	Klonierung
EcoRV_STM0014_fw	1943	66,7	5' CAGGATATCGGGTGTATATCCGGGCTTTT 3'	Klonierung
STM0014_XbaI_rv	1944	65,3	5' CAGTCTAGATCGACACATGGTTGGGAATA 3'	Klonierung

MATERIAL

Primerbezeichnung	Primer	Tm [°C]	Sequenz	Anwendung
pSKpWSK_fw (Seq_for)	1947	67,8	5' CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC 3'	Sequenzierung
pSKpWSK_rv (Seq_rv)	1948	59,3	5' AGCGGATAACAATTTCACACAGGA 3'	Sequenzierung
KJ_rpoS_fw	1686	57,3	5' CCGGGAACAACAGGAAGTTA 3'	<i>rpoS</i> -Anfang
KJ_rpoS_rv	1687	57,3	5' TCGTTGAGACGAAGCATACG 3'	<i>rpoS</i> -Anfang
STM2901_fw	1379	47,7	5' ATGGATACGACAGAAGAACT 3'	RT-PCR
STM2901_rv	1380	53	5' AGGGCGTGCTATTAGGTTGTAT 3'	RT-PCR
STM2902_fw	1659	57,3	5' GGACACAATTCAGCAAGAGG 3'	RT-PCR
STM2902_rv	1660	55,3	5' CGAGTTCGTTCTACATCTTC 3'	RT-PCR
STM2901_02_fw	1661	52,4	5' CATAGCACGATATGTTCCA 3'	RT-PCR
pMALc2Ef	1456	58,8	5' CAGACTGTCGATGAAGCCC 3'	Sequenzierung
pMALc2Er	1457	61,4	5' CGGGCCTCTTCGCTATTACG 3'	Sequenzierung
pBAD_F	354	45,6	5' ATGCCATAGCATTTTATCC 3'	Sequenzierung
pBADRev	355	41,2	5' GATTTAATCTGTATCAGG 3'	Sequenzierung
KJ_yjjU-pMAL_fw	1691	65	5' AATGAATTCATGGGCCAGCGAATACCG 3'	Klonierung
KJ_yjjU-pMAL_rv	1690	68,1	5' AATTCTAGATCACGCCAGATCCTCGTCGGT 3'	Klonierung
KJ_ychK-pBAD_fw	1688	61,9	5' ATGAGAAAAATGAAAAATAGGGCTGGCG 3'	Klonierung
KJ_ychK-pBAD_rv	1694	63,7	5' AACGTCGGTACGCACCAAGGG 3'	Klonierung
KJ_yjjU-pBAD_fw	1689	62,1	5' ATGGCCAGCGAATACCGGTTA 3'	Klonierung
KJ-yjjU-pBAD_rv	1695	61,8	5' CGCCAGATCCTCGTCGGTAAA 3'	Klonierung
KJ_del_ychK_fw	1698	> 75	5' TGTTGCTACGTCTTGAAGCCAGGGGAAGTCG TTAAGTACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'	Deletion
KJ_del_ychK_rv	1697	72,8	5' CCTGTCAGAAATTGCTTAAGTGATCGTAAAA GGTACATTACATATGAATATCCTCCTTAG 3'	Deletion
KJ_del_yjjU_fw	1699	> 75	5' CTTGTCAGCCTGGAAAAAAATGAAAAACAG GAAGGCAGAGGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC 3'	Deletion
KJ_del_yjjU_rv	1696	74,9	5' CTTGTCAGCCTGGAAAAAAATGAAAAACAG GAAGGCAGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'	Deletion
KJ-rpoS2-fw	1778	57,3	5' TTGATGACGTCAGCCGTATG 3'	<i>rpoS</i> -Ende
KJ-rpoS2-rv	1779	59,4	5' GTACCAGCCGCGAACACTAT 3'	<i>rpoS</i> -Ende
KJ-ychK_red-1	1800	66,3	5' TGTTGCTACGTCTTGAAGCCAGGGG 3'	Sequenzierung
KJ-ychK_red-2	1801	59,7	5' CCTGTCAGAAATTGCTTAAGTGATC 3'	Sequenzierung
KJ-yjjU_red-1	1802	58,1	5' CTTGTCAGCCTGGAAAAAAATGAAA 3'	Sequenzierung
KJ-yjjU_red-2	1803	58,1	5' AATCAAAATGGCAGTGTGTATCGAT 3'	Sequenzierung
KJ-K1-Red-Del	1804	57,3	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'	Sequenzierung
KJ-K2-Red-Del	1805	61,4	5' CGGTGCCCTGAATGAACTGC 3'	Sequenzierung
KJ_ychK_Se-Al_fw	1833	66,5	5' GTTGCAAGGATGCGCAATAGGTTCACTG 3'	QuickChange
KJ_ychK_Se-Al_rv	1834	66,5	5' CAGTGAACCTATTGCGCATCCTGCAAC 3'	QuickChange
KJ_yjjU_Se-Al_fw	1835	71	5' TACTTCGGCACAGCAGCCGGTGCGCAA 3'	QuickChange
KJ_yjjU_Se-Al_rv	1836	71	5' TTGCGCACCCGGCTGCTGTGCCGAAGTA 3'	QuickChange
HindIII_yjjU-fw	1934	69,5	5' CAGAAGCTTGC GCGCGCGAAAAATCGTCTTC 3'	Komplementation
yjjU_XbaI_rv	1935	68,1	5' CAGTCTAGATTTTCAACGCCCGCCTCAC 3'	Komplementation
HindIII_ychK-fw	1955	69,5	5' CAGAAGCTTCGGATCGGGTGCTACTCGTT 3'	Komplementation
ychK_XbaI_rv	1956	69,5	5' CAGTCTAGAGCTGCGTCATGTTCTCTCCC 3'	Komplementation

2.10 Verwendete Bakterien und Zellen

Sofern nicht anders angegeben wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme der Stammlung des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere *Enterobacteriaceae* (NRZ) des Robert Koch-Institutes, Außenstelle Wernigerode, entnommen. Patientenstämme sind mit einer Datenbanknummer versehen, Jahr und laufende Eingangsnummer.

MATERIAL

Tabelle M 2.13: Auflistung verwendeter Bakterienstämme der RKI Stammsammlung

Bakterienstamm/ Zelllinie	RKI-Nummer	Herkunft
<i>Salmonella enterica</i> serovar Brandenburg	11-00946	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Derby	11-00953	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Dublin	10-03457	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	11-00758	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis	11-01045	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Senftenberg	11-00856	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2	01-10141	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL1344	02-08508	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	11-01086	RKI
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	11-01087	RKI
<i>Salmonella</i> Subspezies IIIb	11-00929	RKI
<i>Salmonella</i> Subspezies II	10-03134	RKI

Tabelle M 2.14: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstamm/ Zelllinie	Artikelnummer	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> BL21	C161003	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	18258-012	Invitrogen
<i>XL1 Blue Competent Cells</i>	200249	Stratagene
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028	12023	NCTC
<i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC	30234	ATCC
<i>Acanthamoeba castellanii</i> NEFF	30010	ATCC, (Dr. B. Weissenmayer)
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	50998	ATCC
HeLa-Epithelzellen	CCL-2	ATCC LGC Promochem
U937 Makrophagen	CRL-1593.2	ATCC
RAW Makrophagen	TIB-71	ATCC LGC Promochem

2.11 Verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Tabelle M 2.15: Auflistung verwendeter und erzeugter gentechnisch veränderter Organismen (GVO). Die verwendeten Scatterklone (sc), deren Tn5- Insertionsort nicht eindeutig bestimmt werden konnte sind mit einem *n. b.* und Scatterklone deren Tn5- Insertionsort nicht verifiziert werden konnte mit einem *n. v.* angegeben. (Der exakte Tn5-Insertionsort im Genom ist in Tabelle 4.4 angegeben.) *Escherichia coli* wird mit *E. coli* und *Salmonella enterica* mit *S.* angegeben.

Bakterienstamm mit Leervektor	Klon	Konstrukt
<i>E. coli</i> DH5α (pBlueskript II (+) SK)	1	pBlueskript II (+) SK
<i>E. coli</i> DH5α (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>E. coli</i> DH5α (pWSK29)	1	pWSK29
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pKD46)	1	pKD46
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pWRG356.1)	1	pGEN-Pro- <i>ssaG</i> -SFGFP
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 (pBlueskript II (+) SK)	1	pBlueskript II (+) SK
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 (pKD46)	1 - 6	pKD46
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 (pWSK29)	1	pWSK29
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 2 (pBlueskript II (+) SK)	1	pBlueskript II (+) SK
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 2 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 2 (pWSK29)	1	pWSK29
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 3 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 15 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 MvP818 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 MvP818 (pWRG356.1)	1	pGEN-Pro- <i>ssaG</i> -SFGFP
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 P2D6 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 P2D6 (pWRG356.1)	1	pGEN-Pro- <i>ssaG</i> -SFGFP
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 (pFPV25.1)	1	pFPV25.1

MATERIAL

Bakterienstamm mit erzeugtem Plasmid	Klon	Konstrukt
<i>E. coli</i> BL21 (pKJ4)	1 - 4	pMALc2x + <i>yjjU</i>
<i>E. coli</i> BL21 (pKJ6)	1 - 4	pBAD-TOPO + <i>yjjU</i>
<i>E. coli</i> BL21 (pKJ7)	1 - 5	pBAD-TOPO + <i>ychK</i>
<i>E. coli</i> BL21 (pKJ7-S)	1	pBAD-TOPO + <i>ychK</i> ^{S41A}
<i>E. coli</i> C43 (pKJ6-S)	1	pBAD-TOPO + <i>yjjU</i> ^{S61A}
<i>E. coli</i> DH5α (pKJ1)	5, 6	pBlueskript II (+) SK + Pro- <i>STM2901</i>
<i>E. coli</i> DH5α (pKJ2)	1	pWSK29 + Pro- <i>STM2901</i>
<i>E. coli</i> DH5α (pKJ3)	1, 2, 9	pBlueskript II (+) SK + Pro- <i>STM0014</i>
<i>E. coli</i> DH5α (pKJ8)	3, 7	pBlueskript II (+) SK + Pro- <i>yjjU</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pKJ6)	1	pBAD-TOPO + <i>yjjU</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pKJ7)	1	pBAD-TOPO + <i>ychK</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pKJ10)	1, 2	pBlueskript II (+) SK + Pro- <i>ychK</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 (pKJ11)	1, 2, 3	pWSK29 + Pro- <i>ychK</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 Δ <i>ychK</i> ::FRT (pKJ11)	1, 2, 3	pWSK29 + Pro- <i>ychK</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 2 (pKJ1)	1	pBlueskript II (+) SK + Pro- <i>STM2901</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 2 (pKJ2)	1	pWSK29 + Pro- <i>STM2901</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 (pKJ1)	1	pBlueskript II (+) SK + Pro- <i>STM2901</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 (pKJ2)	1	pWSK29 + Pro- <i>STM2901</i>
Bakterienstamm mit definierter Mutation	Klon	Konstrukt
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 MvP818	1	Δ <i>invC</i> ::FRT
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 P2D6	1	<i>ssaV</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 <i>ychK</i> ::aph	1	<i>ychK</i> ::aph
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 Δ <i>ychK</i> ::FRT	1, 2	Δ <i>ychK</i> ::FRT
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 <i>yjjU</i> ::aph	1	<i>yjjU</i> ::aph
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 Δ <i>yjjU</i> ::FRT	1, 2	Δ <i>yjjU</i> ::FRT
<i>S. serovar</i> Typhimurium 14028 Δ <i>yjjU</i> ::FRT <i>ychK</i> ::aph	1, 2, 3	Δ <i>yjjU</i> ::FRT <i>ychK</i> ::aph
Bakterienstamm (Scatterklon) mit Tn5-Insertion	Klon	Konstrukt
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 1	1	<i>STM3004.1n</i> ::Tn5::mutH
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 2	1	<i>STM2901</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 3	1	<i>STM4175</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 4	1	<i>STM11291</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 5	1	<i>STM4575</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 6	1	<i>n. v. (STM1057)</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 7	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 8	1	<i>n. v. (PSLT020.1N)</i> ::Tn5::repA2
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 9	1	<i>STM4595</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 10	1	<i>n. v. (STM4595)</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 11	1	<i>STM1699</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 12	1	<i>STM3636</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 13	1	<i>n. v. (STM2153)</i> ::Tn5::mrp
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 14	1	<i>STM3962</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 15	1	<i>STM0014</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 16	1	<i>n. v. (STM1129)</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 17	1	<i>STM4424.S</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 18	1	<i>STM2672</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 19	1	<i>STM1517</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 20	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 21	1	<i>n. v. (STM4195)</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 22	1	<i>STM4426</i> ::Tn5::STM4427
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 23	1	<i>PSLT095</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 24	1	<i>STM3567</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 25	1	<i>STM1129</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 26	1	<i>n. v. (STM4127)</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 27	1	<i>STM4419</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 28	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 29	1	<i>STM2414</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium LT2 sc clone 30	1	<i>STM3126</i> ::Tn5::STM3127
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 1	1	<i>STM1442</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 2	1	<i>STM1057</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 3	1	<i>STM2080</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 4	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 5	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 6	1	<i>n. v. (STM0438)</i> ::Tn5
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 7	1	<i>STM4018</i> ::Tn5

MATERIAL

Bakterienstamm (Scatterklon) mit Tn5- insertion	Klon	Konstrukt
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 8	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 9	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 10	1	<i>STM1897::Tn5</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 11	1	<i>STM1353::Tn5</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 12	1	<i>STM3601::Tn5</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 13	1	<i>STM3197::Tn5</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 14	1	<i>STM1297::Tn5</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 15	1	<i>n. v. (STM2742::Tn5)</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 16	1	<i>n. v. (STM4086::Tn5)</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 17	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 18	1	<i>n. v. (STM1764::Tn5)</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 19	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 20	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 21	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 22	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 23	1	<i>R64p130::Tn5::R64p131</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 24	1	<i>n. b.</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 25	1	<i>n. v. (STM1764::Tn5)</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 26	1	<i>n. v. (STM1764::Tn5)</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 27	1	<i>ynaI::Tn5::ynaJ</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 28	1	<i>STM0529::Tn5</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 29	1	<i>n. v. (STM3264::Tn5)</i>
<i>S. serovar</i> Typhimurium SL1344 sc clone 30	1	<i>STM3501::Tn5</i>

2.12 Kulturmedien für Bakterien und Zellen

Tabelle M 2.16: Auflistung der Nährmedien zur Anzucht von *Salmonella* und *Escherichia coli*

Luria Bertani (LB) Flüssigmedium	Luria-Bertani (LB)-Agar-Platten
10g Trypton	10g Trypton
5g Hefeextrakt	5g Hefeextrakt
5g NaCl	5g NaCl
H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml	15g Agar
	H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml

Die Bestandteile der beiden Medien wurden zunächst in H₂O_{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.

LB EDO Flüssigmedium (P22-Medium)	50x E-salts
LB Flüssigmedium	670ml H ₂ O _{bidest}
10mM D-Glukose	10g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1x E-salts	100g Zitronen säure x H ₂ O
	500g K ₂ HPO ₄
	175g NaH ₂ NH ₄ PO ₂ x 2 H ₂ O
	H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml

Die Bestandteile des Mediums wurden zunächst in H₂O_{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.

SOB-Medium (Super Optimal Broth-Medium)	SOC-Medium (Super Optimal Broth-Derivat)
20g Trypton	98ml SOB-Medium
5g Hefeextrakt	1ml 2M Mg ²⁺ Stammlösung (20,33 g MgCl ₂ x H ₂ O und
0,584g NaCl	24,65g MgSO ₄ x 7 H ₂ O je 100ml Stammlösung)
0,186g KCl	1ml 2M Glukose Stammlösung (36,04 g Glukose je 100 ml
H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml	Stammlösung)
Die Bestandteile wurden zunächst in H ₂ O _{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.	Vor der Zugabe der Lösungen zum SOB-Medium wurde die Mg ²⁺ -Stammlösung autoklaviert und die Glukose-Stammlösung steril filtriert.

MATERIAL

Non-Nutrient-Agar (NNA)-Platten	
Stocklösung 1	12g NaCl
	0,4g MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	0,6g CaCl ₂ · 6 H ₂ O
	H ₂ O _{bidest} zu 500 ml
Stocklösung 2	14,2g Na ₂ HPO ₄
	13,6g KH ₂ PO ₄
	H ₂ O _{bidest} zu 500 ml
Agar	15g

Die Bestandteile der Stocklösungen 1 und 2 wurden zunächst in H₂O_{bidest} gelöst. Anschließend wurden je 5ml Stocklösung 1 und 2, sowie 15g Agar gemischt und zu 1000 ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und autoklaviert.

Blauagar-Platten	
Standardrezeptur	17g Bacto-Agar
	5g Bacto Pepton
	5g NaCl
	5g Hefeextrakt
	1g Fleischextrakt
	5g Casamino acid
	H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml
Lösungen	24ml 50%ige Glukose-Lösung
	12ml 2%ige Wasserblaulösung

Die Bestandteile wurden zunächst in H₂O_{bidest} gelöst, auf pH 7,7 eingestellt und anschließend autoklaviert. Vor der Zugabe der Lösungen zur Rezeptur bei 60°C, werden diese 30min im Dampftopf sterilisiert.

Tabelle M 2.17: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *A. castellanii* und zur Infektion der Amöben mit *Salmonella*

PYG Kulturmedium (Peptone- Yeast Extract- Glucose)	
20g Pepton	10ml 250mM KH ₂ PO ₄
1g Hefeextrakt	10ml 5mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O
10ml 400mM MgSO ₄ × 7 H ₂ O	2,5g NaCitrat × 2 H ₂ O
10ml 40mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O	50ml 2M Glukose
10ml 250mM Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O	900ml H ₂ O _{bidest}

Alle Bestandteile, außer Glukose, wurden in H₂O_{bidest} gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die steril filtrierte Glukoselösung dazugegeben.

Infektionsmedium
Bestandteile wie PYG Kulturmedium ohne Pepton, Hefeextrakt und Glukose

Tabelle M 2.18: Auflistung des Nährmediums für die Kultivierung und Infektion von U937-Makrophagen

RPMI Kultur- und Infektionsmedium mit 10 % FKS (Roswell Park Memorial Institute Medium)
RPMI 1640 Flüssigmedium
10 % hitzeinaktiviertes FKS

Tabelle M 2.19: Auflistung des Nährmediums für die Kultivierung und Infektion von HeLa-Zellen

DMEM Kultur- und Infektionsmedium mit 10 % FKS (Roswell Park Memorial Institute Medium)
DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine with Sodium Pyruvat Flüssigmedium
10 % hitzeinaktiviertes FKS

MATERIAL

Tabelle M 2.20: Auflistung verwendeter Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100g/ l H ₂ O _{bidest}	100µg/ ml
Carbenicillin (Carb)	100g/ l H ₂ O _{bidest}	100µg/ ml
Chloramphenicol (Cm)	30g/ l EtOH	30µg/ ml
Kanamycinmonosulfat (Km)	50g/ l H ₂ O _{bidest}	50µg/ ml

Die Stammlösungen wurden steril filtriert, Aliquots bei -20°C gelagert und den autoklavierten Medien in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

2.13 Verwendete Software

Tabelle M 2.21: Verwendete Software und Internet-Datenbanken

Datenbank	Adresse
Biocyc	http://www.biocyc.org
ChlamydiaeDB	http://www.clamydiaedb.org
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2
Compute pI/MW tool	http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
OperonDB	http://operondb.cbcb.umd.edu
Phobius	http://phobius.sbc.su.se
Primer 3 Input	http://frodo.wi.mit.edu/primer3
SignalP 4.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
SoftBerry-BPROM	http://linux1.softberry.com
Softberry-FGENESB	http://linux1.softberry.com
FASTA-Protein Analysis	http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1
YeastResourceCenter	http://www.yeastrc.org/pdr/viewProtein.do
Programme	Hersteller
Acolyte (Koloniezählprogramm)	Synbiosis
Clone Manager Professional 9	Clone Manager
Photoshop Elements 6.0	Adobe
DS Gene 1.5	Accelrys
EndNote X4	Thomson Reuters
DNASTAR Lasergene 8	DNASTAR, Inc.
Quantity One	Bio-Rad

3. Methoden

3.1 Anzucht von Bakterien

3.1.1 *Salmonella*

Bei -80°C gelagerte Salmonellen wurden mittels einer sterilen Impföse auf LB-Agar ausgestrichen und nach 16 - 24h Inkubation bei 37°C für ca. 1 Woche bei 4°C gelagert. Die Tn5-Insertionsmutanten von *S. Typhimurium* wurden auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Plasmidtragende Bakterien wurden grundsätzlich auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen angezogen (s. Tabelle M 2.20). Vorkulturen wurden, sofern nicht anders beschrieben, in kleinen Glasröhrchen (Alukappe) mit 3ml LB-Nährbouillon mit/ ohne Antibiotika von Agarplatten angeimpft ($OD_{600} < 0,3$) und für 16 - 24h bei 37°C und 250rpm schüttelnd im 45° Winkel inkubiert. Für Infektionen erfolgte eine anschließende Kultivierung der Hauptkulturen. Hierzu wurde die Vorkultur in großen Glasröhrchen (Alukappe) 1:31 verdünnt und für 3,5h bei 37°C und unter Rotation im Roler Drum bis zur späten exponentiellen Phase ($OD_{600} \sim 2,0$) subkultiviert.

Zur Untersuchung von *Salmonella*-Effektorproteinen wurde eine Kolonie von einer LB-Agarplatte in 5ml LB-Medium + 0,3M NaCl (stimuliert Sekretion der SPI-1 abhängigen Effektorproteine) eingeimpft und für 6h bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,7 - 0,8 schüttelnd inkubiert. Das Schütteln erfolgt hierbei in einem Winkel von 45° und 100rpm, wodurch der Sauerstoffgehalt verringert wurde und Stressbedingungen, wie sie im Darm bei der Besiedlung mit Salmonellen vorkommen, simuliert wurden (Certomat® U/ HK, B. Braun Biotech International, Melsungen). Die Vorkultur wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:3 in frisches LB-Medium überführt. Die Hauptkultur inkubierte über Nacht bei 37°C und 100rpm (round) (Certomat® U/ HK, B. Braun Biotech International, Melsungen).

3.1.2 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Wildtypen und mit Plasmiden transformierten Bakterienstämmen erfolgte aus Glyzerolstockkulturen (s. 3.2) auf entsprechenden LB-Agarplatten für 16 - 24h bei 37°C. Von den bewachsenen Agarplatten wurden aus einer

METHODEN

Einzelkolonie 3ml Vorkulturen in kleinen Glasröhrchen inokuliert ($OD_{600} < 0,3$) und anschließende Hauptkulturen bei Erreichen der späten exponentiellen Phase mit einer $OD_{600} \sim 2,0$ geerntet. Die Induktion der Expression eines *in trans* enthaltenen Gens erfolgte durch Zugabe von L-Arabinose (Endkonzentration 13,33mM) zu Beginn der frühen exponentiellen Phase mit einer OD_{600} der Kultur von 0,6 bis 0,8. Die Expression wurde für 3h bei 37°C fortgeführt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation geerntet und weiterverarbeitet (s. 3.9.1).

Zur Anzucht der *E. coli* Zellen für die Präparation extrachromosomaler DNA wurden entsprechende Kolonien gepickt und auf eine frische antibiotikahaltige LB-Agarplatte überimpft, bevor diese zur Inokulation der 3ml Präparationskultur verwendet wurde. Aus dieser Kultur wurden 2ml pelletiert und anschließend die plasmidale DNA extrahiert (s. 3.5.2).

3.2 Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen

Zur Erzeugung von Langzeitkulturen wurden *S. Typhimurium* und *E. coli* Stämme 16 - 24h auf den entsprechenden Selektivagarplatten angezogen. Nach einem Vereinzelausstrich wurde mittels Impföse eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes in der entsprechenden Nährbouillon ohne/ mit Antibiotika resuspendiert und über Nacht für 16 - 24h kultiviert. Diese Bakterienkultur wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit sterilem Glyzerol vermischt. Die Lagerung der Glyzerolkulturen erfolgte bei -80°C.

3.3 Anzucht von Zellkulturen

Die in flüssigem Stickstoff in Kulturmedium (PYG bzw. RPMI) + 10% DMSO eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und 2min bei 1.000×g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und erneut bei 1.000×g für 10min pelletiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut in Kulturmedium resuspendiert (10ml) und in ein Kulturgefäß überführt. Nach 10 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen erstmalig passagiert. Die Makrophagen wurden hierzu durch Klopfen und die adhärennten Amöben mittels Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst, die adhärennten

Epithelzellen wurden durch Zugabe von Accutase (100%) in Lösung gebracht. Anschließend wurden die Zellen in Intervallen von 3 bis 4 Tagen regelmäßig passagiert (maximal 30×), wobei das Verhältnis von 1:10 bis 1:12 (v/v), Zellen zu Wachstumsmedium, bei den jeweiligen Inkubationslängen berücksichtigt wurde.

3.4 Koinfektion von Amöben, Makrophagen und Epithelzellen mit Salmonellen

3.4.1 Infektion von Amöben

Für die Infektion wurden die Amöben durch Klopfen oder mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche gelöst, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei einem Zentrifugationsschritt von 800×g für 5min in der Labofuge 400 gewaschen. Die Zellzahl wurde durch Zählung in einer Neubauer-Kammer bestimmt und 0,5ml der Zellen mit einer Endkonzentration von 5×10^4 Zellen/ ml Infektionsmedium oder Leitungswasser in jedes *well* einer 24-*well* Platte gegeben. Die Salmonellen wurden für die Infektion wie unter 3.1.1. beschrieben inkubiert. Nach erfolgter Subkultivierung der Bakterien wurden die Stämme auf OD₆₀₀ 0,2 in 1×PBS eingestellt und entsprechend der MOI (*multiplicity of infection*) in Infektionsmedium oder Leitungswasser verdünnt. Je 0,5ml der eingestellten Salmonellen-Suspension wurde pro *well* zu den Amöben gegeben. Anschließend wurde die 24-*well* Platte 5min bei 800×g zentrifugiert, um die Bakterien in direkten Kontakt mit den Amöben zu bringen. Es erfolgte eine Gentamicinbehandlung, zum Abtöten extrazellulärer Bakterien, nach Inkubation über definierte Zeitpunkte bei 37°C und 5% CO₂ sowie ein anschließender Mediumswechsel. Hierzu wurde die 24-*well* Platte 5min bei 800×g zentrifugiert, um die Amöben auf den Boden zu sedimentieren. Danach wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und je *well* vorsichtig 1ml 100µg/ ml Gentamicin in Infektionsmedium oder Leitungswasser gegeben und für 30min inkubiert. Im Anschluss wurde erneut zentrifugiert und das Medium entweder gegen 1ml frisches Infektionsmedium bzw. Leitungswasser oder gegen 1ml 10µg/ ml Gentamicin in Infektionsmedium bzw. Leitungswasser pro *well* getauscht und mikroskopisch ausgewertet. Durch die mikroskopische Auswertung konnte das Infektionsverhalten der zu untersuchenden Stämme bzw. Klone in Bezug auf die Amöben untersucht werden.

3.4.2 Infektion von Makrophagen

Die Replikationsfähigkeit der Salmonellen wurde im U937/ RAW Makrophagen-Infektionsmodell untersucht und dokumentiert. Hierzu wurden die passagierten Monozyten (s. 3.3) 1 - 1,5 Tage vor der Infektion durch Zugabe von 50ng/ μ l PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) zu phagozytierenden Makrophagen ausdifferenziert. Der somit entstandene Zellrasen wurde durch Inkubation mit 10ml 0,2% EDTA in 1 \times PBS für 5min bei 37°C und Klopfen vom Kulturflaschenboden gelöst. Die Zellen wurden in ein steriles Plastikröhrchen überführt und auf ein Zellvolumen von 50ml mit RPMI-Medium ohne FKS-Zusatz aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen in zwei Zentrifugationsschritten bei 800 \times g - 1000 \times g für 5min in der Labofuge 400 gewaschen. Die Zellzahl wurde durch Zählung in einer Neubauer-Kammer bestimmt und 0,5ml der Zellen mit einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ ml RPMI-Medium in jedes *well* einer 24-*well* Platte gegeben. Während der Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für weitere 3,5h erfolgte eine erneute Zelladhäsion. Die Anzucht der Salmonellen erfolgte wie unter 3.1.1. für eine Infektion beschrieben. Nach erfolgter Subkultivierung der Bakterien wurden die Stämme auf OD₆₀₀ 0,2 in 1 \times PBS eingestellt und entsprechend der MOI verdünnt. Je 0,5ml dieser eingestellten Salmonellen-Suspension wurde zu den adhärennten U937/ RAW Zellen gegeben. Daraufhin wurden die 24-*well* Platten für 5min bei 800 \times g zentrifugiert. Hierdurch konnten die Bakterien mit den Makrophagen in unmittelbaren Kontakt treten, was eine Aufnahme der Bakterien begünstigte. Nach Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂ für 25min wurden die *wells* zweimal mit 1 \times PBS gewaschen (800 \times g, 5min). Dadurch wurde eine Vielzahl von Bakterien, die nicht in die Wirtszellen eingedrungen oder an diese adhärnt waren abgespült. Die verbleibenden extrazellulären Salmonellen wurden durch eine 90min Inkubation mit 100 μ g/ ml Gentamicin in RPMI-Medium abgetötet. Nach zwei Waschschrinen bei 800 \times g für 5min wurde RPMI-Medium mit 10 μ g/ ml Gentamicin pro *well* pipettiert und für definierte Zeitpunkte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Konzentration wirkt Gentamicin bakterioatisch und verhindert eine Vermehrung von möglichen extrazellulären Bakterien. Um die intrazelluläre Replikationsfähigkeit zu überprüfen, wurde die Koinfektion bei den angegebenen Zeitpunkten zweimal mit 1 \times PBS gewaschen und anschließend mit 1ml 1 \times PBS versetzt mit 10 μ l 10% Saponin für 5min bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Dies führte zur Lyse der Makrophagen und zur Freisetzung der intrazellulären Bakterien. Auf LB-Agarplatten konnten 100 μ l eines entsprechend verdünnten Aliquots per Hand ausplattiert werden. Durch Zählung der *cfu* der ausplattierten Proben

konnte die Entwicklung der Zellzahl jedes zur Infektion eingesetzten Stammes bzw. Klons verfolgt und Aussagen zur intrazellulären Replikation getroffen werden.

3.4.3 Infektion von Epithelzellen

Die Invasions- und Replikationsfähigkeit der Salmonellen wurde im HeLa-Epithelzellen-Modell untersucht und dokumentiert. Hierzu wurden die passagierten HeLa-Zellen in definierter Zellzahl 1 Tag vor der Infektion in eine 24-*well* Platte ausgesät. Durch Zugabe von 2 - 3ml Accutase (100%) konnte der HeLa-Zellrasen von der Kulturflasche gelöst werden. Nach Überführen in ein steriles Plastikröhrchen wurde die Suspension auf 50ml mit DMEM + 10% FKS-Zusatz aufgefüllt und bei 800×g für 5min in der Labofuge 400 gewaschen. Die Zellzahl wurde durch Zählung in einer Neubauer-Kammer bestimmt und 0,5ml der Zellen mit einer Endkonzentration von 1×10^5 Zellen/ ml DMEM-Medium mit 10% FKS-Zusatz in jedes *well* einer 24-*well* Platte gegeben. Während einer 24h Inkubation (37°C/ 5% CO₂) vermehrten sich die Epithelzellen und erreichten bis zur Infektion Konfluenz. Die Anzucht der Salmonellen für die Infektion wurde wie unter 3.1.1. beschrieben durchgeführt. Nach erfolgter Subkultivierung der Bakterien wurden die Stämme auf OD₆₀₀ 0,2 in 1×PBS eingestellt und entsprechend der MOI verdünnt. Je 0,5ml dieser eingestellten Salmonellen Suspension wurde zu den adhärenenten HeLa-Zellen gegeben. Anschließend wurden die 24-*well* Platten für 5min bei 800×g zentrifugiert. Hierdurch konnten die Bakterien mit den Epithelzellen in engen Kontakt treten, wodurch eine Invasion der Bakterien begünstigt wurde. Danach wurde ähnlich wie unter 3.4.2. fortgefahren. Nach 25min Inkubation wurde zweimal mit 1×PBS gewaschen (800×g, 5min), DMEM + 10% FKS und 100µg/ µl Gentamicin pro *well* gegeben und 1h inkubiert. Im Anschluß wurde das Medium durch DMEM + 10% FKS und 10µg/ µl Gentamicin ersetzt und für die restliche Dauer definierter Zeitpunkte bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Um die Invasion und Replikationsfähigkeit der Salmonellen zu überprüfen, wurde die Koinfektion bei den angegebenen Zeitpunkten zweimal mit 1×PBS gewaschen (800×g, 5min), und anschließend mit 1ml 0,1% Triton X-100 in 1×PBS für 5min bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Dies führte zur Lyse der HeLa-Zellen und zur Freisetzung der Bakterien. Auf LB-Agarplatten konnten 100µl eines entsprechend verdünnten Aliquots per Hand ausplattiert werden. Durch Zählung der *cfu* der ausplattierten Proben konnte die Entwicklung der Zellzahl jedes zur Infektion eingesetzten Stammes bzw. Klons verfolgt und Aussagen zur Invasion und intrazellulären Vermehrung getroffen werden.

3.5 Grundlegende Nukleinsäure-Techniken

3.5.1 Isolierung genomischer DNA

Über-Nacht-Kulturen wurden in LB-Nährbouillon mit/ ohne Antibiotika von Agarplatten angeimpft ($OD_{600} < 0,3$) und für 16 - 24h bei 37°C und 250rpm schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation von 2ml der Vorkulturen bei 13.000rpm für 2min wurde das Pellet in 500µl SET-Puffer [75mM NaCl; 25mM EDTA; 20mM Tris-base; pH 7.5] aufgenommen, mit 50µl frisch angesetztem Lysozym (10mg/ ml) und 5µl RNase (100mg/ ml) für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden dem Lysat 60µl 10% SDS sowie 3µl Proteinase K (18,6mg/ ml) zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren homogenisiert. Darauf folgte eine 2h Inkubation mit gelegentlichem Umdrehen bei 55°C. Nach Zugabe von 210µl 6M NaCl und 850µl Chloroform wurde 1h bei Raumtemperatur unter Rotation (Rotator) inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10min bei 8.000rpm. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Die nach vorsichtigem Mischen weiß ausfallende DNA wurde 10min bei 13.000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut 10min bei 13.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und anschließend in 50µl H₂O resuspendiert. Zur vollständigen Suspendierung der genomischen DNA wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten genomischen DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop-Gerätes durchgeführt und resultierte in 10 - 500ng/ µl. Ein Maß für die Reinheit der DNA errechnet sich aus dem Quotient A_{260}/A_{280} , wobei ein Wert von 1,8 optimal ist. Werte kleiner als 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, während Werte größer als 1,8 auf das Vorhandensein von RNA schließen lassen.

3.5.2 Isolierung extrachromosomaler DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels „*Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification System*“-Kit der Firma Promega bzw. „*QIAprep Spin Mini Prep*“-Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde quantitativ durch Messung der optischen Dichte bei 260nm im Spektrophotometer (NanoDrop) bestimmt und für weitere Experimente wie z. B. *QuickChange*-Mutagenese (s. 3.5.9), Transformation (s.

3.7.3) oder Sequenzierreaktionen (s. 3.5.10) verwendet. Die Reinheit der DNA errechnet sich aus dem Quotient A_{260}/A_{280} (s. 3.5.1).

3.5.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des „*peqGOLD RNAPureTM*“-Reagenz (PeqLab), einer optimierten Guanidinisothiocyanat/ Phenol-Methode zur Extraktion von RNA humanen, tierischen und bakteriellen Ursprungs. Hierbei wurde eine Bakterienkultur bis OD_{600} von 1-1,5 angezogen und davon 2ml bei 5000rpm für 5min pelletiert. Nach Angaben des Herstellers wurde 1ml „*peqGOLD RNAPureTM*“ zu dem Bakterienpellet gegeben und mit dem empfohlenen Protokoll fortgefahren. Isolierte RNA wurde in 40µl RNase *free water* gelöst und die Konzentration an RNA im NanoDrop-Gerät gemessen und die Reinheit aus dem Quotient A_{260}/A_{280} errechnet (s. 3.5.1).

3.5.4 Restriktionsverdau/ Dephosphorylierung

Die Restriktion mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte spezifisch innerhalb ihrer Erkennungssequenzen an doppelsträngiger DNA. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) erworben und mit den zugehörigen Puffern in die jeweiligen Reaktionen eingesetzt. Für den Verdau von 1µg DNA wurden 1µl an Enzym in einem Reaktionsvolumen von meist 30µl verwendet und für 3h bei 37°C (Temperatur ist abhängig von dem verwendeten Enzym) inkubiert. Zur Überprüfung erfolgter Restriktion wurden die Fragmente auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt.

Um eine Religation des Vektors zu minimieren, wurde der geschnittene Vektor mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (*Antarctic Phosphatase*) dephosphoryliert. Hierzu konnte der hitzeinaktivierte Restriktionsenzym/ DNA-Mix ohne einen zusätzlichen Reinigungsschritt verwendet werden. Nach Zugabe von *Antarctic Phosphatase*-Puffer und 1µl an Enzym wurde der Ansatz 1h bei 37°C inkubiert und anschließend für 20min bei 65°C inaktiviert.

Zum Entfernen von Puffer- und Enzymresten, wurden die Fragmente mittels des „*Wizard SV Gel & PCR cleanup System*“-Kit (Promega) bzw. „*QIAquick PCR Purification*“-Kit oder „*QIAquick Gel Extraction*“-Kit (Qiagen) entweder direkt aus dem PCR-Ansatz oder nach

METHODEN

erfolgter Elektrophorese aus dem 1%igen (w/v) Agarosegel ausgeschnitten und gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung für anschließende Ligationsansätze wurde mit Hilfe des NanoDrop-Gerätes durchgeführt (s. 3.5.1).

3.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der DNA Ligase des Bakteriophagen T4. In einem Ligationsvolumen von 10µl wurden ungefähr 50ng Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1:3 mit dem zu insertierenden DNA-Fragment vermischt und unter Zugabe von 1µl T4 DNA Ligase und 10x Puffer für 15 - 18h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mittels EtOH-Fällung (s. 3.5.6) für die Transformation (s. 3.7.3) in die jeweiligen Bakterienstämme vorbereitet.

3.5.6 Fällung von Nukleinsäuren mittels EtOH

Nach erfolgter Ligation wurde die Nukleinsäure mittels EtOH gefällt, um reine und konzentrierte DNA zu erhalten. Die zu fällende Lösung wurde mit einer Endkonzentration an 0,3M Natriumazetat (pH7,0) und dem doppelten Volumenanteil an unvergälltem 95%igen (v/v) EtOH vermischt und anschließend für 15min bei 16.000rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das unsichtbare DNA-Präzipitat mit 70% (v/v) EtOH versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei 37°C getrocknet, in 3µl ddH₂O aufgenommen und sofort in *E. coli* DH5α transformiert (s. 3.7.3).

3.5.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Sequenzen *in vitro* exponentiell amplifiziert werden. Die Neusynthese eines Nukleinsäureabschnittes erfolgt mittels DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) für Klonierungsschritte bzw. aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) für Kolonie- und Standard-PCR's sowie zweier synthetisch, die Sequenz einrahmenden, Oligonukleotide. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 25µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

METHODEN

Tabelle M 3.1: Reaktionsansatz für eine Standard- und Kolonie-PCR

Komponente	[μ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	1 Kolonie oder 20 - 200 ng	-	-
Puffer	2,5	10-fach-konzentriert	1-fach
dNTPs	0,5	10 mM jedes dNTP	0,2 mM jedes dNTP
Oligonukleotid 1	0,5	50 μ M	1 μ M
Oligonukleotid 2	0,5	50 μ M	1 μ M
DNA-Polymerase	1	2,5 U/ μ l (<i>Pfu</i>), 5 U/ μ l (<i>Taq</i>)	0,1 U/ μ l (<i>Pfu</i>), 0,2 U/ μ l (<i>Taq</i>)
H ₂ O	add 25 μ l Gesamtansatz	-	-

Die Annealingtemperatur wurde den Oligonukleotiden spezifisch angepasst. Für die Kolonie-PCR wurden die zu untersuchenden Zellen vor der PCR mit ddH₂O für 10min bei 99°C lysiert. Anschließend wurde der Puffer-Enzym-Primer-Mix zugegeben und folgendes Standard-Programm zur Amplifikation der gewünschten Produkte verwendet:

Tabelle M 3.2: PCR-Programm für eine Standard- und Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	4 min
2. Denaturierung	30	95°C	1 min
3. Annealing	30	50 - 65°C	1 min
4. Elongation	30	72°C	1 - 3 min
5. Finale Elongation	1	72°C	10 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden auf 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch überprüft und gegebenenfalls weiter gereinigt.

3.5.8 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Für die Bestimmung der Genexpression wurde die Methodik der reversen Transkription angewandt. Durch Zugabe von TurboTM DNase (Ambion) wurde isolierte RNA (s. 3.5.3) von DNA-Kontaminationen befreit. In einem Gesamtansatz von 10 μ l wurde 1 μ g RNA mit 1 μ l Enzym und 1 μ l RNaseOUTTM für 1h bei 37°C inkubiert, bevor die DNase durch Temperaturerhöhung auf 75°C für 10min inaktiviert wurde. 1 μ l des DNase-Restriktionsansatzes wurde in weiterführenden RT-PCR Experimenten eingesetzt. Einzelsträngige cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation des Produktes wurde mit Hilfe des „OneStep RT-PCR“-Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

METHODEN

Tabelle M 3.3: Reaktionsansatz für eine RT-PCR

Komponente	[μ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
RNA	1	ca. 100ng/ μ l	5 ng/ μ l
OneStep RT-PCR Puffer	4	5-fach-konzentriert	1-fach
dNTP Mix	0,8	10 mM jedes dNTP	0,4 mM jedes dNTP
RT-PCR Enzym Mix	0,8	-	-
Oligonukleotid 1	0,3	50 μ M	0,75 μ M
Oligonukleotid 2	0,3	50 μ M	0,75 μ M
RNase free water	12,8	-	-

Das RT-PCR Profil wurde nach Angaben des Herstellers erstellt, wobei die Annealing-Temperatur der Oligonukleotide an das jeweilige Experiment angepasst wurde.

Tabelle M 3.4: PCR-Programm für eine RT-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Reverse Transkriptase	1	50°C	30 min
2. Initiale PCR Aktivierung	1	95°C	15 min
3. Denaturierung	35	95°C	40 sec
4. Annealing	35	60°C	1 min
5. Elongation	35	72°C	4 min
6. Finale Elongation	1	72°C	10 min
7. Pause	∞	4°C	∞

Um noch vorhandene DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jedem Experiment ein Ansatz mitgeführt, der nach dem Schritt der reversen Transkription zu den anderen Proben in den Thermocycler gestellt wurde. Nach erfolgter Reaktion wurden die Amplifikate auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel analysiert.

3.5.9 Einfügen von Punktmutationen

Um zielgerichtete Punktmutationen zu generieren wurde mit dem „*QuickChange Site-Directed Mutagenese*“-Kit von Stratagene gearbeitet. Für die Reaktion wurden spezifische Mutageneseoligonukleotide (s. Tabelle M 2.12) konstruiert und nach Herstellerangaben in einem empfohlenen 50 μ l Reaktionsansatz eingesetzt.

Tabelle M 3.5: Reaktionsansatz für eine QuickChange-PCR

Komponente	[μ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	variabel	-	5 - 50 ng
Reaktionspuffer	5	10-fach-konzentriert	1-fach
Oligonukleotid 1	1	-	125 ng
Oligonukleotid 2	1	-	125 ng
dNTP Mix	1	10 mM	0,2 mM
H ₂ O	add 50	-	-
<i>Pfu</i> Polymerase	1	2,5 U/ μ l	0,05 U/ μ l

METHODEN

Tabelle M 3.6: PCR-Programm für eine QuickChange-Reaktion

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	30 sec
2. Denaturierung	12 - 18	95°C	30 sec
3. Annealing	12	55°C	1 min
4. Elongation	12	68°C	1min/ kb Plasmid Größe

Nach der erfolgten PCR wurde der Ansatz für 2min auf Eis gelagert und anschließend mit 1µl Enzym für 1h bei 37°C *DpnI* verdaut, um die methylierte, nicht mutierte parentale DNA abzubauen.

3.5.10 Sequenzierung

Basierend auf der Didesoxy-Methode nach Sanger [148] wurde die DNA-Sequenzierung mit Hilfe von „*ABI BigDye Terminator 3.1 Premix*“ durchgeführt. Der 10µl Reaktionsansatz und das PCR-Profil wurden wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle M 3.7: Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	variabel	100 ng/µl – 300 ng/µl	10 ng/µl – 30 ng/µl
<i>ABI</i> Puffer	1,5	5-fach- konzentriert	0,75-fach
Big Dye 3.1	1	-	-
Oligonukleotid	0,5	10 µM	0,5 µM
steriles H ₂ O	add 10	-	-

Tabelle M 3.8: PCR-Programm für eine Sequenzierungs-Reaktion

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	96°C	2 min
2. Denaturierung	25	96°C	10 sec
3. Annealing	25	50 - 58°C	5 sec
4. Elongation	25	60°C	4 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion erfolgte durch Mitarbeiter des Robert Koch-Institutes (Berlin). Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe der *Lasergene SeqMan* Software (s. 2.13) durchgeführt.

3.6 Herstellung von *Salmonella Typhimurium knockout*-Mutanten

Alle erfolgten chromosomalen Integrationen wurden mit der von Datsenko und Wanner entwickelten „*One-step inactivation*“-Methode [146] durchgeführt. Diese Methode beruht auf

METHODEN

dem von Murphy entwickelten λ red System [149]. Eine Übersicht der Mutantenerzeugung ist in Abbildung M 3.1 dargestellt.

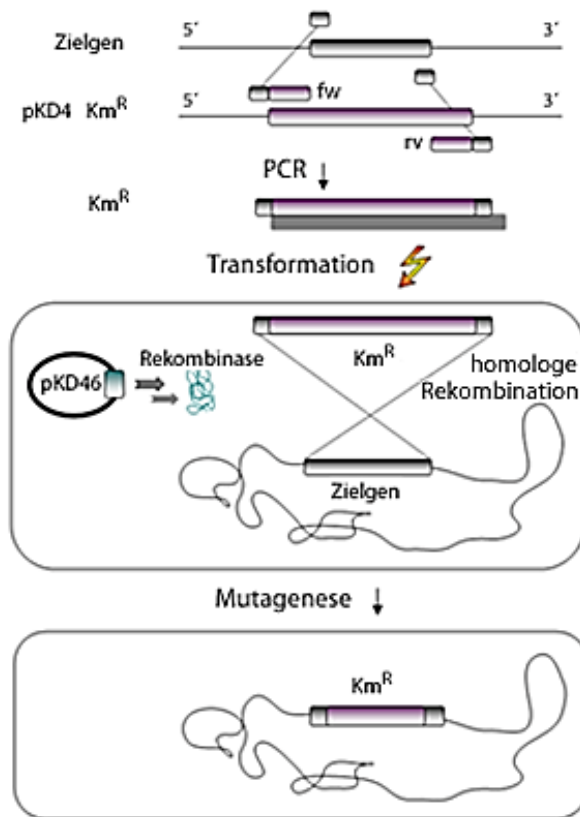


Abbildung M 3.1: Schematische Darstellung einer genomischen Integration nach Datsenko und Wanner. Das zu integrierende Fragment ist eine Resistenzkassette (magenta). Die zur Integration notwendigen homologen Bereiche zur Zielsequenz (grau) werden über PCR Reaktionen mit überhängenden Oligonukleotiden (grau-magenta) eingebracht. Das so entstandene Integrationselement wird unter Verwendung des Helferplasmids pKD46 in das Chromosom über homologe Rekombination eingebaut.

3.6.1 Herstellung von Mutagenesekonstrukten mittels PCR

Zur Herstellung von *Salmonella* Typhimurium *knockout*-Mutanten wurde nach der Methode von Datsenko und Wanner [146] gearbeitet. Hierbei wurde das Zielgen durch Rekombination mit einer Resistenzkassette ausgetauscht.

In einer PCR Reaktion wurde die Kanamycinresistenzkassette amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so erstellt, dass sie 40bp von Anfang und Ende des Zielgens sowie 20bp der Kanamycinresistenzkassette des Vektors pKD4 enthielten (Abb. M 3.2). Die entsprechenden Sequenzen der *Salmonella* Gene wurden in der Genomdatenbank NCBI an der Genomsequenz von *Salmonella* Typhimurium LT2 (NC_003197.1) recherchiert. Der 50µl Reaktionsansatz und das PCR-Profil wurden wie folgt zusammengesetzt:

METHODEN

Tabelle M 3.9: Reaktionsansatz für eine KO-PCR

Komponente	[μ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
H ₂ O	28,5	-	-
Oligonukleotid 1	5	3 μ M	0,3 μ M
Oligonukleotid 2	5	3 μ M	0,3 μ M
dNTP's	5	2 mM	0,2 mM
High Fidelity	0,25	5 U/ μ l	0,025 U/ μ l
10x High Fidelity	5	10-fach-konzentriert	1-fach-konzentriert
Template pKD4	2,5	-	-

Tabelle M 3.10: PCR-Programm für eine KO-Reaktion

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	4:30 min
2. Denaturierung	30	95°C	45 sec
3. Annealing	30	60°C	45 sec
4. Elongation	30	72°C	90 sec
6. Final Elongation	1	72°C	10 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden auf 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch überprüft und mittels des „*QIAquick PCR Purification*“-Kit (Qiagen) direkt aus dem PCR-Ansatz oder mittels EtOH Fällung (s. 3.5.6) aus dem PCR-Ansatz gereinigt.

Das entstandene DNA-Fragment wurde mittels Elektroporation (s. 3.7.4.2) in den Zielstamm transformiert, welcher das Helferplasmid pKD46 enthielt (s. 3.7.1). Das temperatursensitive Plasmid trägt Komponenten für das λ red System unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren P_{BAD} Promoters (Abb. M 3.2). Mit diesem System können lineare DNA Fragmente, die über homologe, überlappende Bereiche verfügen, sequenzspezifisch und basenpaargenau mittels homologer Rekombination in das bakterielle Chromosom integriert werden. Die Überprüfung der Integration erfolgte auf Selektivagarplatten und anschließender Kolonie-PCR (s. 3.5.7).

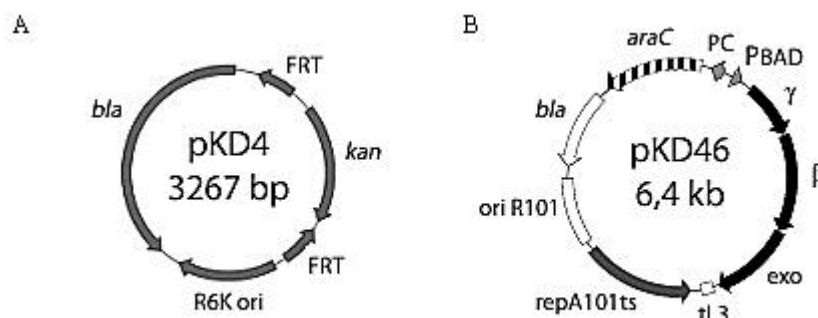


Abbildung M 3.2: Schematische Darstellung der Helferplasmide. **A:** pKD4. Template-Plasmid für die Kanamycinresistenzgenkassette, welche von FRT-sites flankiert ist. Das Plasmid trägt ein R6K Replicon und eine Ampicillinresistenzgenkassette [150]. **B:** pKD46. Die Komponenten des λ red Systems γ , β und exo stehen unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promoters P_{BAD}. Des Weiteren trägt das Plasmid den Repressor AraC und eine Ampicillinresistenz. Durch den temperatursensitiven Replikationsursprung kann das Plasmid nach Integration des PCR Fragments durch eine Temperaturerhöhung eliminiert werden. (Image pKD46.png: University of Sheffield /Wet Lab)

METHODEN

Die kanamycinresistenten *knockout*-Mutanten wurden noch zweimal über Nacht bei 37°C auf LB-Agarplatte mit Kanamycin vereinzelt, durch die anschließende Inkubation über Nacht bei 44°C wurde das temperatursensitive Helferplasmid eliminiert. Der Verlust von pKD46 wurde durch das Ausstreichen der *knockout*-Mutanten auf LB-Agarplatten mit Ampicillin, Inkubation über Nacht bei 37°C und dessen Sensitivität gegenüber Ampicillin überprüft.

3.6.2 Bakterienmutantenerzeugung mittels P22 Phagentransduktion

Mit Hilfe des Salmonellen-spezifischen P22 Phagen kann eine definierte Mutation von einem Salmonellenstamm auf einen anderen übertragen werden. Die Phagentransduktion bietet zum einen den Vorteil eine Mutation in einen „frischen“ Stammhintergrund zu transferieren, wodurch Mehrfachinsertionen und *second site* Mutationen ausgeschlossen werden können und zum anderen ermöglicht sie eine schnelle Erzeugung von Doppelmutanten. Eine Übersicht der P22 Transduktion ist in Abbildung M 3.3 dargestellt.

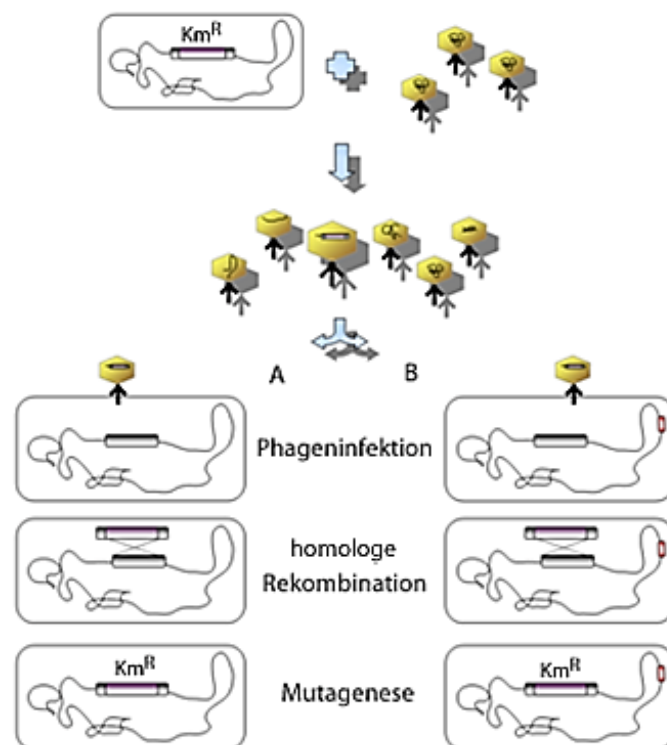


Abbildung M 3.3: Schematische Darstellung der Mutagenese mittels P22 Phagentransduktion. Definierte Mutationen können mittels Bakteriophagen von einem Stamm auf einen anderen übertragen werden. **A)** Erzeugung einer *knockout*-Mutante. Der Donorstamm wird mit dem Phagen bis zur Lyse inkubiert. Der Phage kann freie DNA-Fragmente in seine Proteinhülle einbauen. Die neuen Phagen enthalten beliebige Genabschnitte u. a. die Resistenzgenkassette. Wird ein Rezipient mit dem Phagenlysat infiziert, können die DNA-Fragmente übertragen und über homologe Rekombination in das Genom des Empfängerstammes eingebaut werden. **B)** Herstellen einer Doppel-*knockout*-Mutante. Trägt der Rezipient bereits eine Mutation (rotes Rechteck), kann mittels Phagentransduktion eine weitere definierte Mutation an anderer Stelle im Genom erzeugt werden.

3.6.2.1 Erzeugung transduzierender P22-Lysate

Für die Herstellung von transduzierendem P22-Lysat wurden 500µl einer Über-Nacht-Kultur des Donorstammes (14028 *yjjU::aph* (vor Phagentransduktion = vP) und 14028 *ychK::aph* (vP)) zu 2ml P22-enhaltenden LB EDO (ca. 10^6 pfu/ ml) hinzugefügt. Die Kultur wurde bei 37°C für 4 - 8h im Roler Drum lysiert. Intakte Bakterien sowie Zelltrümmer von 1,5ml des Ansatzes wurden durch 5min Zentrifugation bei 4°C und 16.000rpm pelletiert. Anschließend wurde 1ml Überstand mit dem rekombinanten Phagen und 50µl Chloroform gemischt, um bakterielle Verunreinigungen zu verhindern. Das Lysat wurde bei 4°C gelagert.

3.6.2.2 Transduktion und Selektion

Für die Transduktion eines Empfängerstammes wurde dieser über Nacht kultiviert. 100µl der Vorkultur wurden mit 10µl entsprechendem P22-Lysat für 15min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 900µl LB-Medium mit 10mM EGTA erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln. Im Anschluss wurden 100µl auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und 1 - 3 Tage bei 37°C bebrütet.

Zur Selektion transduzierter Bakterien wurde mittels Vereinzelungsausstrich zweimal auf selektiven Agarplatten mit EGTA überimpft, um Mehrfachinfektionen des Phagen zu verhindern. Durch anschließendes Überimpfen auf "Blauagarplatten" wurden positive Transduktanten auf Phagenverunreinigung überprüft. Phagenfreie Bakterien wachsen zu weißen Kolonien heran, wohingegen P22 kontaminierte, lysierte Salmonellen dunkelblau wachsen.

3.6.2.3 Deletion des Resistenzmarkers

Um den Resistenzmarker zu entfernen wurde das pCP20 Helferplasmid, welches die Rekombinase kodiert, genutzt. Dieses Plasmid trägt zusätzlich zu seiner Ampicillinresistenz einen temperatursensitiven Replikationsursprung [144].

Elektrokompetente Zellen des rekombinanten Stammes (s. 3.7.1) wurden hergestellt und pCP20 elektroporiert. Die Zellen wurden auf selektiven LB-Agarplatten mit Ampicillin und bei 30°C inkubiert, um die FLP-Rekombinase zu exprimieren, welche auf pCP20 kodiert ist.

METHODEN

Der Verlust der *aph* Resistenzgenkassette und die Erhaltung des pCP20 Plasmids wurde durch paralleles Ausstreichen der Klone auf Kanamycin und Ampicillin Agarplatten überprüft. Klone welche kanamycinsensitiv und ampicillinresistent waren, wurden mittels Kolonie-PCR auf das Fehlen der *aph* Resistenzgenkassette überprüft. Positive Klone wurden über Nacht bei 44°C inkubiert, was zur Folge hat, dass die FLP-Rekombinase reprimiert wird und zusätzlich zum Verlust des Helferplasmids führt. Durch paralleles Ausstreichen der Klone auf Ampicillin und antibiotikafreie LB-Agarplatten, wurde die erfolgreiche Entfernung des pCP20 überprüft und ampicillinsensitive Klone selektiert.

In resistenzmarkerfreien Klonen verbleibt nach der FLP-Rekombination eine „FRT-Narbe“ anstelle der Antibiotikaresistenzgenkassette. Der Nachweise einer erfolgreichen Deletion des Resistenzmakers erfolgte mittels Kolonie-PCR (s. 3.5.7).

3.7 Herstellung und Transformation kompetenter *Salmonella* und *E. coli*

Vor der Transformation müssen die Bakterien in einen für die Aufnahme von Plasmid-DNA „kompetenten“ Zustand überführt werden. Hierbei wird die Bakterienoberfläche derart verändert, dass die Fremd-DNA daran binden und aufgenommen werden kann.

3.7.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* und *Salmonella*

Für die Herstellung elektrokompetenter Salmonellen zur Generierung von *knockout*-Mutanten wurde der pKD46 tragende Zielstamm in 3ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht bei 30°C kultiviert. Die Hauptkultur wurde in 50ml frischem Medium mit 10mM L-Arabinose 1:100 angeimpft und bei 30°C, 150rpm bis OD₆₀₀ 0,5 - 0,8 wachsen gelassen, um die Expression der Rekombinase zu induzieren.

Ansonsten wurde für die Herstellung kompetenter *E. coli* und *Salmonella* eine 10ml Über-Nacht-Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde im Verhältnis 1:100 angesetzt und bei 37°C, 250rpm bis OD₆₀₀ 0,5 - 0,8 inkubiert. Nachdem die Kultur in ein steriles Reaktionsgefäß überführt wurde, erfolgte eine 20min Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurde die Kultur mehrfach gewaschen und jeweils bei 7000rpm für 10min pelletiert und die Zellen 20min auf Eis inkubiert. Im ersten Waschschrift wurde das Pellet im gleichen Volumen eiskaltem Aqua bidest resuspendiert und im Zweiten in 0,5 Volumen eiskaltem Aqua bidest.

METHODEN

Danach erfolgte die Aufnahme in 0,05 Volumen eiskaltem 10% Glycerin. Das finale Zellpellet wurde in 0,01 Volumen eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen und direkt zur Weiterverarbeitung verwendet oder in 45µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

3.7.2 Herstellung von chemischkompetenten *E. coli*

Zur Herstellung von chemischkompetenten *E. coli* wurde eine Über-Nacht-Vorkultur angezogen und eine Hauptkultur 1:100 in frisches LB-Medium angeimpft. Nach 2h Inkubation bei 37°C und 250rpm wurden die Zellen bei 4°C für 5min und 6000rpm pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 0,5 Volumen einer sterilen 0,1M CaCl₂ Lösung resuspendiert und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in 0,25 Volumen der sterilen 0,1M CaCl₂ Lösung aufgenommen. Die erhaltenen chemischkompetenten Zellen wurden direkt zur Transformation (s. 3.7.3) genutzt.

3.7.3 Transformation von DNA

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in kompetente Zellen. Hierbei werden die Bakterien mit der Fremd-DNA (meist Plasmid-DNA) gemischt. Durch einen kurzen Elektro-/ Hitzeschock wird die Membran destabilisiert, so dass die DNA in das Zytoplasma der Bakterien gelangen kann. Durch die Plasmid-DNA erhalten transformierte Bakterien eine Antibiotikaresistenz, so dass man sie durch anschließende Kultivierung auf entsprechenden Agarplatten selektieren kann.

3.7.3.1 Hitzeschock Transformation

a) DH5α/ BL21:

Für die Transformation in *E. coli* wurden 50µl frisch kompetente Zellen (s. 3.7.2) mit 1 - 3µl Fremd-DNA gemischt und 20min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 1min. Im Anschluss wurde sofort 1ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben und schüttelnd bei 37°C für 1h inkubiert. Der Ansatz wurde

METHODEN

für 3min bei 5000×g sedimentiert und im Rücklauf resuspendiert. Zur Selektion der Transformanten wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

b) *XLI-Blue* superkompetente Zellen:

Die Transformation in *XLI-Blue* Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Ein Aliquot von 50µl Zellen wurden in ein Polypropylenröhrchen gegeben und mit 1µl *DpnI*-verdauter DNA (s. 3.5.9) gemischt. Der Ansatz wurde 30min auf Eis inkubiert und anschließend wurde für 45sec bei 42°C transformiert. Nach 2 minütiger Inkubation auf Eis wurden 500µl auf 42°C vorgewärmtes SOC-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und für 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 3min bei 5000×g sedimentiert und im Rücklauf resuspendiert. Zur Selektion der Transformanten wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

3.7.3.2 Elektroporation

a) *Salmonella*:

Für die Elektroporation in *Salmonella* wurden 40µl kompetente Zellen mit ca. 500ng Plasmid gemischt. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben im Gene Pulser II von BIO-RAD mit dem EC2 Programm. Danach wurde sofort 1ml, auf 37°C vorgewärmtes, SOC-Medium zu dem Elektroporationsansatz gegeben und in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss inkubierten die Zellen für 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln. Der Ansatz wurde für 3min bei 5000×g sedimentiert und im Rücklauf resuspendiert. Zur Selektion der Transformanten wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Gewachsene Kolonien wurden in einer anschließenden Kolonie-PCR (s. 3.5.7) auf die Aufnahme des Plasmides überprüft.

b) *E. coli*:

Für die Elektroporation in *E. coli* wurden 20µl elektrokompeter Zellen (s. 3.7.1) mit 2µl Ligationsansatz in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette und auf Eis vermischt. Die DNA-Aufnahme erfolgte im eisgekühlten *Cell Porator* bei 330µF, 200 DC Volt und 4kΩ. Transformierte Zellen wurden in 1ml vorgewärmtem SOC-Medium für 1h bei 37°C geschüttelt und anschließend 100µl der Suspension auf Selektivagar ausgebracht. Die

restlichen 900µl wurden für 2min bei 3.000×g pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im Mediumrücklauf erneut resuspendiert und als Ganzes ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und gewachsene Kolonien in anschließender Kolonie-PCR (s. 3.5.7) auf die Aufnahme des Plasmides überprüft.

3.8 Elektrophoresen und Western Blot

3.8.1 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in einem 1%igem (w/v) Agarosegel und 1×TAE als Elektrophoresepuffer. Die mit 0,2 Volumenanteilen Probenpuffer versetzten Proben wurden bei 100V für ca. 1h aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte eine 30 minütige Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad (2µg/ ml EtBr in 1×TAE). Die Detektion fand bei 254nm im UV-Transilluminator statt. Bei präparativen Gelen wurden die erforderlichen Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit dem „*Qiaquick Gel extraction*“-Kit (Qiagen) weiter bearbeitet.

3.8.2 SDS-PAGE

Die größenabhängige Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli [151]. Die Proben wurden mit je 5µl reduzierendem Protein-Probenpuffer versetzt (s. Tab. M 2.5), 1min bei 99°C denaturiert und in SDS-Laufpuffer bei 100V - 150V und bei Raumtemperatur aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine im Gel wurde die Coomassie-Färbemethode angewandt:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in kolloidal Coomassie-Färbelösung nach dem Rezept des Herstellers und unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch anschließende Inkubation in H₂O. Zur Protokollierung wurden die Gele gescannt und dokumentiert.

3.8.3 Immunochemischer Nachweis von Proteinen im Western Blot

Beim Blotten werden die Proteine eines denaturierenden SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Danach erfolgt der Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern.

Methodisch wird wie folgt vorgegangen:

In Vorbereitung wurde eine PVDF-Membran mit 100% Methanol benetzt und anschließend in Transferpuffer getränkt. Vier, auf Gelgröße zugeschnittene, Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Anodenseitig wurden zwei Filterpapiere gelegt, darauf wurde die aktivierte Membran, das SDS-PAGE-Gel und abschließend zwei, in Transferpuffer getränkte, Filterpapiere positioniert. Nach Anschluss der Kathode wurde der Western Blot im *semidry*-Blotter mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel für 1h bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Vor der Reaktion mit dem ersten Antikörper wurden die freien Proteinbindungsstellen der Membran für mind. 1h mit 5%iger Blocklösung abgesättigt. Der geblockte Blot wurde dann mind. 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit einem α -Antigen-Antikörper, verdünnt in 5%iger Blocklösung, inkubiert. Durch anschließendes dreimaliges Waschen der Membran für 10min mit TBST wurde der ungebundene Antikörper entfernt und eine weitere 1h Inkubation mit einem Enzym-markierten Antikörper, verdünnt in 5%iger Blocklösung, erfolgte. Nach drei abschließenden Waschschritten für je 10min in TBST wurde die Immunreaktion mit dem „*ECL Western Reagents*“-Kit (Amersham) nach Herstellerangaben detektiert.

Vorbereitend für die spezifische Identifikation von *Salmonella*-Effektorproteinen durch die Western Blot-Technik, wurden die Proteine wie folgt gewonnen:

Nach Kultivierung der 20ml Hauptkultur der entsprechenden Stämme wie unter 3.1 beschrieben, wurden die Kulturen für 30min auf Eis gelagert und anschließend in Polycarbonat-Zentrifugen-Röhrchen (Beckman, Krefeld) bei 4°C, 20.000rpm für 1h zentrifugiert (AvantiTM Centrifuge J-25, Beckman Coulter, Krefeld). Der Überstand wurde sterilfiltriert und in Säure- und Aceton-beständigen Polyethylen-Röhrchen (PE, Beckman, Krefeld) einer 10%igen TCA-Fällung unterzogen. Diese fand für 1h auf Eis statt. Danach wurde erneut bei 4°C und 20.000rpm für 1h zentrifugiert. Das Sediment wurde in 400µl 0,1M NaOH resuspendiert, mit 2ml eiskaltem (-20°C) Aceton versetzt und für mindestens 20min bei -20°C aufbewahrt. Darauf folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C, 20.000rpm für 15min. Die Acetonwaschung wurde 2x mit 2,5ml eiskaltem Aceton wiederholt. Nach dem

METHODEN

finalen Zentrifugationsschritt wurde das Sediment bei RT getrocknet. Die Proteinsedimente wurden in Lämmli-Puffer aufgenommen (Überstand konzentriert ca 1:2000) und die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran ebenfalls mittels *semidry* Blot-Verfahren übertragen. Dafür wurden pro Blot zwei Filterpapiere in Anodenpuffer 1 (0,3M Trishydroxymethylaminomethan [36,3g], 20%iges Methanol add 1L) ein Filterpapier in Anodenpuffer 2 (25mM Trishydroxymethylaminomethan [3,0g], 20%iges Methanol add 1L) und drei Filterpapiere in dem Kathodenpuffer (25mM Trishydroxymethylaminomethan [3,0g], 40mM ϵ -Aminocapronsäure [5,2g], 0,01% SDS, 20%iges Methanol add 1L) getränkt. Die PVDF-Membran wurde für ca. 1min in Methanol beidseitig benetzt. Dies dient der Aktivierung der Membranoberfläche und gewährleistet somit die Aufnahme der Proteine. Anschließend wurde die PVDF-Membran in Anodenpuffer 2 gründlich getränkt. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung M 3.4 schematisch veranschaulicht. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran erfolgte bei 22 V und 150 mA für 15 min.

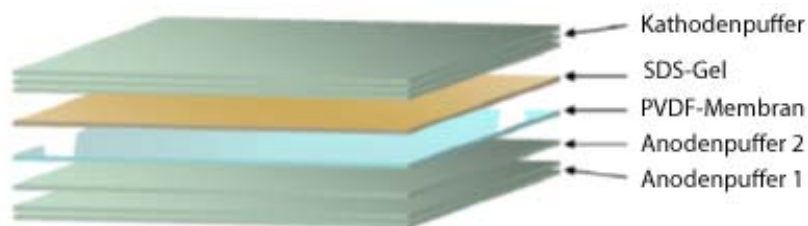


Abbildung M 3.4: Schematische Darstellung des Western Blot-Aufbaus in der Blotting-Kammer. Durch die Verwendung der unterschiedlichen Puffer entsteht ein elektrochemischer Gradient, der über die angelegte Spannung von 22 V bei 150 mA den Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran ermöglicht.

Für die Western Blot-Analyse wurden spezifisch bindende, polyklonale Antikörper gegen die unterschiedlichen Effektorproteine verwendet (s. Tabelle M 2.8) und die anschließende Färbung mit Alkalischer Phosphatase ermöglichte die Detektion.

3.9 Expression und Reinigung von Protein

Die Herstellung von rekombinantem Protein erfolgte nach Klonierung der entsprechenden Gene in den pBAD-TOPO Vektor von Invitrogen und Expression in *E. coli* BL21. Dieser Expressionvektor verfügt über einen arabinoseinduzierbaren P_{BAD} Promotor und enthält zusätzlich ein V5-Epitop, sowie sechs Histidinreste am C-Terminus, die eine Reinigung über Affinitätschromatographie ermöglichen.

METHODEN

Die Methode der TOPO-Klonierung ermöglicht es, in einem Schritt ein PCR Produkt in einen Vektor zu klonieren. Die Klonierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR wurde dabei mit einer *Taq*-Polymerase durchgeführt, weil hierdurch, anders als bei *proof reading* Polymerasen, am Ende der PCR Produkte A-Überhänge erzeugt werden. Der in dem „*pBAD-TOPO*[®] *TA Expression*“-Kit (Qiagen) enthaltene Vektor hat ebenfalls diese Überhänge und ist an eine TOPO-Isomerase gekoppelt. Dieses Enzym ligiert das PCR Produkt in den Vektor.

3.9.1 Expression und Zellaufschluss

Für die Expression in *Salmonella* wurde eine 3ml Vorkultur in LB-Medium mit erforderlichem Antibiotikum angezogen. Die 3ml Expressionskultur wurde 1:100 angeimpft und bei einer OD von 0,6 - 0,8 mit 0,2% L-Arabinose (13,33mM) induziert. Die Expression erfolgte bei 37°C für 3h bzw. 5h im Schüttelinkubator bei 250rpm.

Für die Expression in *E. coli* BL21 wurde eine 3ml Vorkultur in LB-Medium mit erforderlichem Antibiotikum angezogen. Die 250ml Expressionskultur wurde 1:100 angeimpft und bei einer OD von 0,6 - 0,8 mit 0,2% L-Arabinose (13,33mM) induziert. Die Expression erfolgte bei 37°C für 3h im Schüttelinkubator bei 250rpm. Im Anschluss wurde die Kultur bei 4°C und 6000rpm für 20min sedimentiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde bis zur Reinigung des exprimierten rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie bei -20°C gelagert.

Für die Zelllyse wurde das Bakteriensediment einer 250ml Expressionskultur mit 13ml Proteinbindepuffer und mit 1:25 eingesetztem Proteaseinhibitor EDTA_{free} resuspendiert. Die Probe wurde anschließend im Hochdruckhomogenisator (Emulsiflex C3) nach Empfehlung des Herstellers aufgeschlossen. Nach einer 20min Zentrifugation bei 20.000rpm und 4°C wurde der Überstand, welcher das lösliche Protein enthielt, abgenommen und bis zur weiteren Nutzung in der FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) auf Eis gelagert.

3.9.2 Proteinreinigung

Die Reinigung des exprimierten Proteins erfolgte über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie an His Trap HP Säulchen von Amersham. Das bakterielle Zelllysate mit dem Polyhistidin-markiertem Protein wurde mit 1ml/ min auf die nach Herstellerangaben äquilibrierte Säule gegeben und anschließend mit Elutionspuffer fraktionell eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend in der SDS-PAGE und mittels Western Blot auf gereinigtes V5/ 6×His-getagtes Protein hin untersucht und bei 4°C gelagert.

3.10 Immun-/ Fluoreszenzmikroskopie

Für die Infektion von Zellen wurden u. a. GFP-exprimierende Bakterien verwendet. Diese Infektionen wurden direkt in einer 24-*well* Platte mikroskopisch ausgewertet.

3.10.1 Fixierung von Zellen

In einer 24-*well* Platte befindliche Deckgläschen mit infizierten Zellen wurden dreimal mit 1×PBS gewaschen. Nach einem 10min Zentrifugationsschritt bei 1000×g wurde der Überstand verworfen und pro *well* 200µl 3%iges (w/v) PFA gegeben und für 30 - 60min bei RT fixiert. Zur Lagerung der fixierten Zellen wurden je *well* 600µl 1×PBS gegeben und die mit Parafilm versiegelten Platten unter Lichtausschluss bei 4°C bis zur Immunfärbung und Mikroskopie aufbewahrt.

3.10.2 Immunfärbung von Präparaten

Die auf Deckgläschen fixierten Zellen, die mit GFP-exprimierenden Bakterien infiziert waren, wurden dreimal mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger mit „*ProLong Gold Antifade*“ mit oder ohne DAPI (Invitrogen) *gemounted*. Nach einer Trocknungszeit bei RT von 24h und unter Lichtausschluss konnten die Objekte mikroskopisch begutachtet werden.

METHODEN

Zur differentiellen Immunfärbung von *Salmonella* in Zellen wurden die fixierten Proben zuerst dreimal mit 1×PBS gewaschen. Für die Färbung von extrazellulären Bakterien wurde mit Puffern ohne Detergenz gearbeitet. Sämtliche Schritte erfolgten bei RT, als Waschpuffer wurde 1×PBS verwendet, die Antikörper wurden in Waschpuffer verdünnt und die Inkubationsschritte wurden in einer Feuchtkammer durchgeführt. Zum Blocken der Zellen wurden die Deckgläschen 1h auf Parafilm in 50µl Blocklösung (1×PBS, 50mM NH₄Cl, 5% Ziegenserum) inkubiert. Nach einem Waschschrift durch zehnfaches Eintauchen in Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (50µl *Salmonella* O Antiserum) für 1h. Nach dreimaligem Waschen, wie zuvor beschrieben, wurde die Probe für 1h mit 50µl des sekundären Antikörpers inkubiert.

Für die Färbung der intrazellulären Bakterien ist es erforderlich die Wirtszellen porös zu machen, damit die Antikörper in die Zelle eindringen können. Um dies zu gewährleisten wurde den Puffern 0.1% Triton X-100 als Detergenz hinzugefügt. Ansonsten erfolgte die Färbung in der gleichen Abfolge wie oben beschrieben.

Zum Abschluss wurde das Deckgläschen dreimal gewaschen, für ca. 30min bei 37°C getrocknet und die Proben mit „ProLong Gold Antifade“ mit oder ohne DAPI (Invitrogen) *gemounted*. Nach 24h Trocknungszeit bei RT und unter Lichtausschluss konnten die Objekte mikroskopisch untersucht werden.

3.11 Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben

Das Scatter-Screening Verfahren dient der Identifizierung amöbensensitiver Mutanten (Scatterklone) in einem Agar-basierten Assay [152]. Die Methode wurde für den Erreger *Legionella* etabliert und sollte für den Einsatz bei *S. Typhimurium* geprüft werden.

3.11.1 Screen der Tn5-Mutanten

Für den Screen auf Amöbensensitivität erfolgte die Anzucht der bei -80°C gelagerten Tn5-Transposon-mutagenisierten Klonbänke der Stämme *S. Typhimurium* LT2 und SL1344 und der jeweiligen Wildtypen auf LB-Agarplatten mit/ ohne Antibiotikum. Von den bebrüteten Agarplatten wurde Koloniematerial mit einer sterilen Impföse abgenommen und in Infektionsmedium für *Acanthamoeba* auf eine OD₆₀₀ von 0,3 ($\sim 1 \times 10^8$ Zellen/ ml) eingestellt

METHODEN

und anschließend 100.000-fach mit Infektionsmedium verdünnt. Um eine MOI von 0,01 zu erhalten, wurden die Amöben auf 1×10^5 Zellen/ ml in Infektionsmedium eingestellt und davon 1ml zu 1ml der Bakterienverdünnung gegeben. Die anschließende Koinkubation wurde für 30min bei 37°C durchgeführt. Danach wurden pro Tn5-mutagenisierten Stamm je 50x 100µl auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Die WT-Kontrollen wurden entsprechend auf je einer einzelnen antibiotikafreien LB-Agarplatten ausplattiert. Alle Platten wurden für 16 - 24h bei 37°C inkubiert und anschließend bei RT bzw. konstanten 25°C gelagert und die Kolonien täglich begutachtet. Abbildung M 3.5 zeigt die schematische Darstellung des Screens auf Suszeptibilität gegenüber Amöben.

Nach mehreren Tagen Inkubation bei Raumtemperatur (23 - 25°C) wurden amöbensensitive Salmonellen mit einer wildtypfremden strahlenförmigen Koloniemorphologie sichtbar. Auffällige Kolonien wurden aus der Mitte heraus gepickt und anschließend auf LB-Agarplatten mit Blasticidin überimpft, welches die Abtötung der möglicherweise mitgepickten Amöben gewährleisten sollte. Später wurden die Klone auf LB-Agarplatten zur Herstellung von Glyzeringefrierkulturen angezogen und bei -80°C weggefroren.

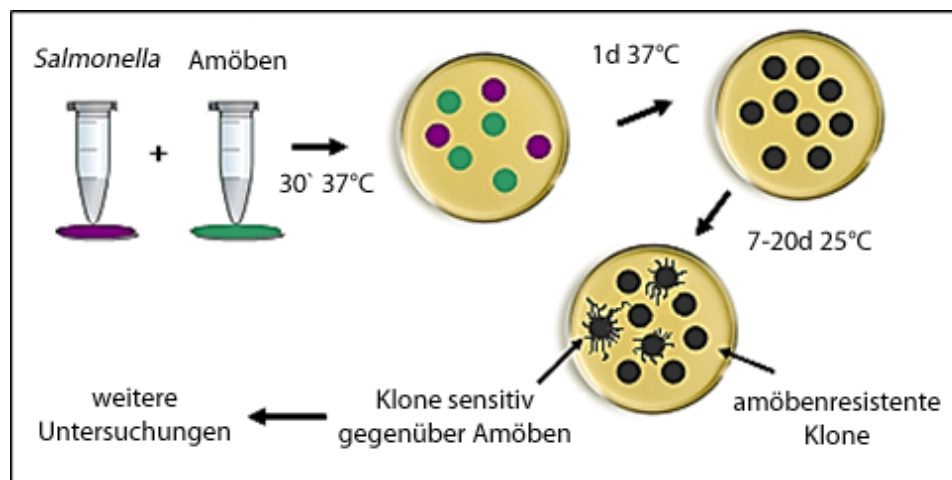


Abbildung M 3.5: Schematische Darstellung des Screens auf Suszeptibilität gegenüber Amöben. Eine Salmonellen-Amöben-Suspension wurde nach Koinkubation auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Nach standardisierter Kultivierung bei Raumtemperatur zeigen amöbensensitive Mutanten eine auffällige Koloniemorphologie, die sich am besten als „sonnenförmiges Ausbreiten“ beschreiben lässt.

3.11.2 Identifizierung der Transposoninsertionsorte

Zur Lokalisation der Transposons in den verschiedenen *Salmonella* Scatterklonen wurde von jedem Klon die genomische DNA isoliert (s. 3.5.1) und mit Hilfe von Restriktionsenzymen hydrolytisch gespalten. Die Restriktion wurde mit dem Enzym Hind III wie unter 3.5.4

METHODEN

beschrieben angesetzt und über Nacht für 16h verdaut und anschließend für 20min bei 65°C inaktiviert. Eine Ligation der restriktionsverdauten DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 400µl. Hierzu wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 1µl T4 DNA Ligase und 10x Puffer für 15 - 18h bei 16°C inkubiert.

Um die Tn5-Insertionsorte in den Scatterklonen zu identifizieren wurde die inverse PCR verwendet [153, 154]. Dazu wurden die zirkulären Restriktionsfragmente mit den Oligonukleotiden Inv 1 EZTN/ Inv 2 EZTN oder KAN-2 FP/ KAN-2 RP, welche auf dem Transposon lokalisierte und dort nach „außen“ gerichteten Bindestellen besitzen, in die Reaktion eingesetzt. Für eine modifizierte Variante wurden die Oligonukleotide Inv 2 EZTN/ KAN-2 RP für die Reaktion verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 25µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle M 3.11: Reaktionsansatz für eine inverse/ modifizierte inverse PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
Template DNA	5	-	-
Puffer	2,5	10-fach-konzentriert	1-fach
dNTPs	0,5	10 mM jedes dNTP	0,2 mM jedes dNTP
Oligonukleotid 1	0,5	50µM	1 µM
Oligonukleotid 2	0,5	50 µM	1 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	1	5 U/µl	0,2 U/µl
<i>RNase free water</i>	add 25	-	-

Folgendes Programm wurde im Thermocycler für die inverse bzw. modifizierte inverse PCR verwendet:

Tabelle M 3.12: PCR-Programm für eine inverse PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	1:30 min
2. Denaturierung	30	95°C	30 sec
3. Annealing	30	47°C (Inv) oder 54°C (KAN)	30 sec
4. Elongation	30	72°C	4 min
5. Finale Elongation	1	72°C	10 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Tabelle M 3.13: PCR-Programm für eine modifizierte inverse PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	1:30 min
2. Denaturierung	5	95°C	30 sec
3. Annealing	5	47°C	30 sec
4. Elongation	5	72°C	4 min
5. Denaturierung	30	95°C	30 sec
6. Annealing	30	54°C	30 sec
7. Elongation	30	72°C	4 min
8. Finale Elongation	1	72°C	10 min
9. Pause	∞	4°C	∞

METHODEN

Die Produkte der inversen PCR wurden im 1%igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf das Vorhandensein einer dominanten Bande pro Reaktionsansatz überprüft. Entsprechende Amplifikate wurden mittels des „*QIAquick PCR Purification*“-Kit oder „*QIAquick Gel Extraction*“-Kit (Qiagen) entweder direkt aus dem PCR-Ansatz oder nach erfolgter Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Nach anschließender Sequenzierreaktion (s. 3.5.10) konnten die erhaltenen Sequenzdaten, die das integrierte Transposon flankierten, per BLAST-Analyse untersucht und der genaue Insertionsort bestimmt werden.

3.12 Amöben-Plattenassay

Um die Interaktion von Bakterien mit Amöben zu untersuchen wurden verschiedene Agar-Plattenassays durchgeführt.

3.12.1 Plaqueassay

Um zu untersuchen, ob Amöben in der Lage sind Bakterien zu verwerten, wurde ein Plaqueassay durchgeführt. Hierzu wurden Bakterien aus einer 3ml Vorkultur in 1×PBS auf OD₆₀₀ 0,3 eingestellt und 1ml der Suspension durch Schwenken auf eine NonNutrient-Agarplatte (NNA) aufgebracht. Nach dem Trocknen der Agarplatten bei RT wurden 10µl einer 2×10⁵ Zellen/ ml in Infektionsmedium eingestellten Amöbensuspension mittig auf die Platten aufgetropft. Im Anschluss wurden die Platten mit Parafilm luftdicht verschlossen (Schutz vor Austrocknung) und bei RT gelagert. Die Platten wurden täglich auf Bildung von Plaques im Bakterienrasen untersucht.

3.12.2 Amöbenresistenztest

Bei dem als Amöbenresistenztest genannten Plattenassay wurde das Scatterverhalten (=„sonnenförmiges Ausbreiten von Bakterienkolonien“) verschiedener Bakterienstämme untersucht. Hierzu wurden Amöben in Infektionsmedium auf 5×10⁶ Zellen/ ml eingestellt und 400µl dieser Probe auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei RT getrocknet. Die

METHODEN

Bakterienstämme wurden über Nacht auf Agarplatten angezogen und von der Platte in Infektionsmedium auf OD₆₀₀ 0,3 eingestellt. Auf die getrockneten Agarplatten wurden dann jeweils 2µl einer 1:100 Verdünnung der Bakteriensuspension getropft und bei 23 - 25°C mit Parafilm verschlossen (Schutz vor Austrocknung) inkubiert. Die Platten wurden täglich auf Bildung des Scatterphänotyps der Bakterienkolonien untersucht.

3.13 Nachweis von Phospholipaseaktivität

3.13.1 Gewinnung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen

Aus einer 3ml Vorkultur wurde eine 3ml Hauptkultur mit OD₆₀₀ 0,3 angeimpft und bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde 1ml Kulturvolumen bei 5000×g für 5min sedimentiert. Anschließend wurden 800µl Kulturüberstand und das Bakterienpellet separiert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Zur Lagerung der gewonnenen Kulturüberstände bei 4°C wurden diese mit einer finalen Konzentration von 3mM Natriumazid versetzt. Die Zellpellets wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 50 µl einer Lysozym/Triton X-100 Lösung [10mg Lysozym und 1µl Triton X-100 in 1ml 40mM Tris-HCl, pH 7.5] und anschließender Inkubation bei 37°C für ca. 30min erreicht. Danach wurde das lysierte Zellpellet mit einer „26-gauge“ Kanüle homogenisiert und mit 40mM Tris-HCl (pH 7.5) auf das Ausgangskulturvolumen (1ml) aufgefüllt. Die Kulturüberstände wurden gegebenenfalls in einem Amicon-Röhrchen mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa konzentriert (10-fach).

3.13.2 Verdau von Lipidsubstraten

Um die lipolytische Aktivität zu untersuchen, wurden Substrate von verschiedenen Phospholipiden mit Kulturüberständen und Zelllysaten oder gereinigtem rekombinanten Protein inkubiert.

Zuerst wurden die Substrate mit einer Endkonzentration 13,4mM und unter Zusatz von 6mM NaN₃, 1% Triton X-100 und 40mM Tris-HCl (pH 7.5) angesetzt. Danach erfolgten ein Inkubationsschritt von 10min stationär bei RT und ein weiterer für 30min schüttelnd bei 37°C. Im Anschluss wurden die Substrate einer Ultraschallbehandlung von jeweils dreimal

METHODEN

15sec andauernden Intervallen bei einer Intensität von 65% unterzogen. Für die Reaktion wurden die Substrate in einem Verhältnis 1:1 mit den zu analysierenden Proben versetzt (je 25µl) und variable Zeitspannen in einer 96-*well* Mikrotiterplatte bei 37°C und 150rpm oder 100rpm über Nacht inkubiert. Dabei richteten sich die Inkubationsdauer und die jeweiligen Verdünnungen nach den spezifischen experimentellen Bedingungen.

3.13.3 Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren

Die Detektion der freien Fettsäuren erfolgte mit Hilfe des Nefa-C-Test Kits der Firma WAKO. Hierbei wurden 10µl des Inkubats unter 5 minütiger Schüttelinkubation bei Raumtemperatur mit 50µl Reagenz R1a und anschließend weitere 5 Minuten mit Reagenz R2a unter Lichtausschluss bei gleichen Bedingungen inkubiert. Der bei Vorhandensein von freien Fettsäuren erfolgte Farbumschlag wurde im Mikrotiterplattenreader durch Bestimmung der OD₅₅₀ gemessen. Die Konzentration an freien Fettsäuren wurde auf Basis einer Standardkurve errechnet, die mittels des im Kit mitgelieferten Ölsäurestandards generiert wurde.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium Stämmen gearbeitet. Im weiteren Verlauf werden diese Stämme vereinfacht mit STM bezeichnet.

4.1 Identifizierung von *Salmonella* Genen mit Bedeutung für die Bakterien-Amöben-Interaktion

Der Scatter Screen ist ein Verfahren, welches in unserer Arbeitsgruppe bereits für *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) etabliert wurde. Das agarbasierte Screening Verfahren beruht auf der natürlichen Amöbenresistenz von *L. pneumophila* und ermöglicht es, durch den technisch einfach durchführbaren Versuchsablauf, aus einer mutagenisierten *L. pneumophila* Klonbank im hohem Durchsatz Klone zu selektieren, welche durch die Mutation essentielle Gene inhibiert und somit Amöbensensitivität erlangt haben. Namensgebend für dieses Screening Verfahren ist die Ausbildung von Scatterkolonien apathogener *L. pneumophila* Klone in Interaktion mit Amöben. Die Analyse der Scatterklone ermöglicht es, wichtige Gene, die an der Amöbenkolonisierung beteiligt sind, als neue Virulenzfaktoren zu identifizieren [152].

Daraus entwickelte sich die Idee weitere pathogene Erreger, wie *Salmonella* in diesem Screen zu untersuchen, da auch sie gegenüber eukaryoten Zellen, u. a. Amöben widerstandsfähig sind [17, 19]. Durch die Analyse möglicher amöbensensitiver Mutanten sollten neue *S. Typhimurium* Gene mit Virulenzfaktorpotential identifiziert werden. Dazu wurde wie in den folgenden Kapiteln beschrieben vorgegangen.

4.1.1 Transposon-Mutagenese

Für die Durchführung des Amöben-Screens wurde in Vorarbeit in der Arbeitsgruppe durch eine Transposon-Mutagenese mit dem „EZ-TN5TM <KAN-2> Tnp TransposomeTM“ Kit der Firma Epicentre[®], eine Tn5-mutagenisierte STM LT2 und STM SL1344 Klonbank generiert (Flieger und Rydzewski, *unpublished*). Hierbei sollte mit hoher Wahrscheinlichkeit jedes Gen eine Tn5-Insertion enthalten, um das *Salmonella* Genom umfassend abzudecken.

4.1.1.1 Berechnung der Wahrscheinlichkeit für die Genomabdeckung

Durch die nach Angaben des Herstellers durchgeführte Transposon-Mutagenese konnten insgesamt je ca. 10.000 Klone für den STM Stamm LT2 und den Stamm SL1344 gezählt werden. Mit nachfolgender Formel von Liberati und Mitarbeitern [155] wurde die statistische Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der in jedes Gen bzw. vor jedes Gen das Transposon mindestens einmal integriert haben sollte.

Formel von Liberati und Mitarbeitern:

$$p = 1 - \left[1 - \left[l / g \right] \right]^n$$

p = Wahrscheinlichkeit, mit der jedes Gen des Genoms mindestens einmal betroffen ist
l = durchschnittliche Länge der Gene
g = Genomgröße
n = Zahl der Mutanten

Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit für den STM Stamm LT2 wurde die 2001 von McClelland veröffentlichte Genomgröße, inklusive des Plasmids verwendet [156] und entsprechend für den STM Stamm SL1344 die *bis dato* vom Sanger Institut veröffentlichte Genomgröße inklusive dreier Plasmide. Es ergab sich somit eine Genomabdeckung von 88,6% für STM LT2 und 87,8 % für STM SL1344 (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Daten zur statistischen Wahrscheinlichkeit der Genomabdeckung der Transposon-Mutagenese. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung erfolgte mit der Formel von Liberati und Mitarbeitern [155]. Die Daten für den STM LT2 wurden an der Genomsequenz der NCBI Datenbank NC_003197.1 erstellt und für den STM SL1344 an der veröffentlichten Genomsequenz des Sanger Instituts.

Genom	Genomgröße mit Plasmiden [bp]	durchschnittliche Länge der Gene [bp]	Anzahl der Mutanten	Wahrscheinlichkeit
STM LT2	4,951×10 ⁶	1077	10.000	88,6 %
STM SL1344	5,067×10 ⁶	1068	10.000	87,8 %

4.1.2 Scatterphänotyp für *Salmonella*

Der von Auraß *et al* (2009) publizierte Scatterphänotyp ist für Legionellen in der Interaktion mit Amöben als ein Marker für den Verlust der wildtypstammeigenen Amöbenresistenz zu sehen. Die mikroskopische Untersuchung des *Legionella* Scatterphänotyps zeigt, dass die Bakterienkolonien von einem rauen, mattglänzenden Ring umgeben sind (Abb. 4.1, b). Dieser Ring, der aus drei diskreten Regionen aufgebaut ist, umschließt ausschließlich die

ERGEBNISSE

apathogenen *L. pneumophila* Kolonien und beinhaltet Amöben, welche die Bakterienkolonien allmählich dezimieren [152].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal für mutagenisierte Salmonellen eine auffällige Koloniemorphologie, resultierend aus der Interaktion mit *Acanthamoeba castellanii* auf Agarplatten, beschrieben. Anders als bei dem *Legionella* Scatterphänotyp zeigten diese Salmonellenkolonien einen Phänotyp der als „sonnenförmiges“ Ausbreiten (scattern) der Kolonie zu sehen (Abb. 4.1, d) und auf die Amöbenbewegung in bzw. aus der Kolonie zurückzuführen war. Solche Amöbenbewegungen in „abgegrastem“ Koloniebereichen und die Dissemination von Salmonellen durch Amöben wurden bereits für die Interaktion mit *A. polyphaga* beschrieben, wobei sich Mikrokolonien entlang einer Amöben-„Spur“ ausbilden [18]. Im Gegensatz zu einer runden, glatten *Salmonella* Wildtypkolonie (Abb. 4.1, c), konnte erstmals in der Interaktion mit *A. castellanii* eine „strahlenförmige“ Ausbreitung der Mutantenkolonie und damit verbundene Bildung von Mikrokolonien entlang der Amöbenbewegung gezeigt werden. Nach weiterer Inkubation bei Raumtemperatur (RT) verstärkte sich dieser Phänotyp und die Bakterienkolonie, sowie die umliegenden Mikrokolonien wurden, stärker und eher als die Wildtypkolonien, durch die Amöben dezimiert (Abb. 4.1, e). Daher wurden diese auffälligen Mutantenkolonien als amöbensensitiv beschrieben, die Koloniemorphologie als charakteristischer *Salmonella* Scatterphänotyp bezeichnet und die Mutanten Scatterklone (sc) genannt.

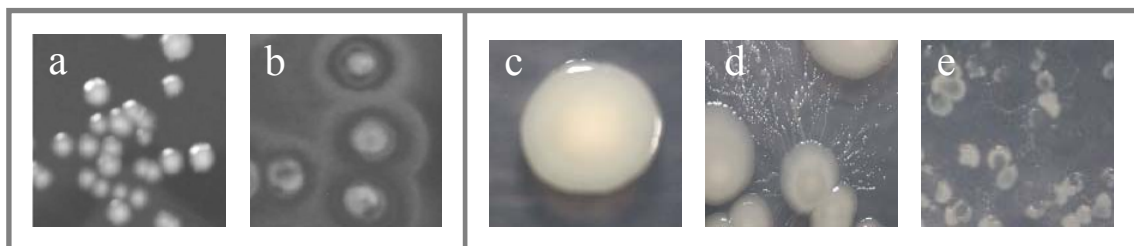


Abbildung 4.1: Charakteristischer Scatterphänotyp. *Legionella pneumophila* (a, b) und *Salmonella* Typhimurium (c-d) Kolonien auf Agarplatten mit *Acanthamoeba castellanii* bei RT. Legionellenkolonie auf BCYE-Agarplatten: **a)** *L. pneumophila*-WT Morphologie, **b)** *L. pneumophila*-Scatterphänotyp [152]. Salmonellenkolonie auf LB-Agarplatten: **c)** STM LT2 WT Morphologie nach 14 Tagen, **d)** „strahlenförmiger“ *Salmonella* Scatterphänotyp nach 14 Tagen Inkubation **e)** verdeutlicht das Dezimieren der Scatterkolonien durch die Amöben (nach 22 Tagen).

In weiteren Untersuchungen wurde der STM Stamm 14028 und zwei isogene Mutanten, mit einem etablierten Invasions- ($\Delta invC$) und Replikationsdefekt ($\Delta ssaV$) in verschiedenen Infektionsmodellen, in der Interaktion mit Amöben auf LB-Agarplatten auf die Bildung des Scatterphänotyps getestet. Bei den Virulenzmutanten MvP818 ($\Delta invC$) und P2D6 ($\Delta ssaV$)

ERGEBNISSE

konnte bereits nach 5 bzw. 10 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur eine deutlich ausgebildete „strahlenförmige“ Koloniemorphologie (Scatterphänotyp) beobachtet werden. Zwar bildeten auch 1 - 15% der Kolonien des 14028 Wildtyps diesen Phänotyp aus, hier war die „strahlenförmige“ Koloniemorphologie jedoch weniger intensiv und zudem nach 10 Tagen deutlich später ausgebildet worden, als bei der $\Delta invC$ -Mutante (Abb. 4.2).

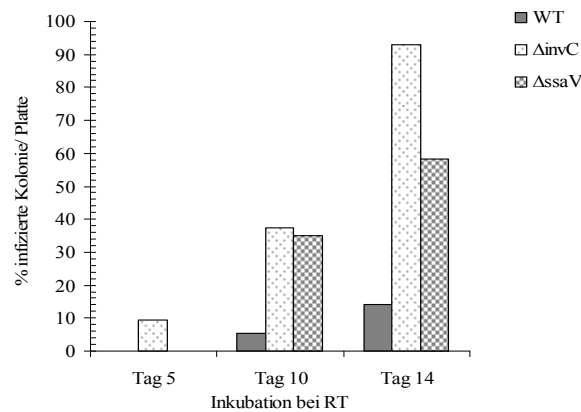


Abbildung 4.2: Bildung des *Salmonella* Scatterphänotyps bei etablierten STM Virulenzmutanten. Diagramm der prozentualen Scatterphänotyp-Bildung der Bakterienkolonien pro Platte. Die Daten repräsentieren einen prozentual ausgewerteten Versuch. Die Phänotypbildung der Stämme wurde in > 3 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Bei den Kolonien beider Mutanten konnte also eine frühzeitige und verstärkte Bildung des „strahlenförmigen“ Scatterphänotyps im Vergleich zum Wildtypstamm beobachtet werden. Die erzielten Ergebnisse bestätigten somit die Hypothese, dass der *Salmonella* Scatterphänotyp, ähnlich wie bei Legionellen, in Zusammenhang mit der Virulenz zu betrachten ist. Die amöbensensitiven Scatterklone waren daher von besonderem Interesse, weil die betroffenen mutierten Gene vermutlich zur Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegenüber Amöben beitragen und bedeutend für die Salmonellen-Amöben-Interaktion sind. Aus diesem Grund wurde in einem Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben auf Bakterienkolonien mit dem charakteristischen *Salmonella* Scatterphänotyp gescreent und diese selektiert.

4.1.3 Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben

Um neue *Salmonella* Typhimurium Gene mit Virulenzfaktorpotential zu identifizieren, wurde basierend auf dem Versuchsablauf des für *Legionella pneumophila* etablierten Scatter Screens [152], ein agarbasierter Screen auf Widerstandsfähigkeit von Salmonellen gegenüber Amöben

ERGEBNISSE

durchgeführt. Amöben bieten den Vorteil aufgrund ihrer „Robustheit“ in einem agarbasierten Assay genutzt zu werden, was mit eukaryotischen Zelllinien, der typischen Wirte von Salmonellen, nicht möglich ist.

In der Interaktion von *S. Typhimurium* Mutanten mit *A. castellanii* zeigte sich dabei, wie unter 4.1.2 beschrieben, eine auffällige, „strahlenförmige“ *Salmonella* Koloniemorphologie, die wie für Legionellen als Scatterphänotyp bezeichnet wurde. Dieser charakteristische Phänotyp war in Zusammenhang mit der Virulenz zu betrachten, da er aufgrund einer Mutation in essentiellen Genen mit dem Verlust der Resistenz gegenüber Amöbenfraß resultierte.

Ein erster Screen auf Suszeptibilität von mutagenisierten *S. Typhimurium* gegenüber Amöben wurde von Jennifer Bender durchgeführt (in Berlin, *unpublished*). Hierbei wurden insgesamt ca. 27.000 Kolonien der mutagenisierten Klonbänke von STM LT2 und STM SL1344 gescreent. Im Falle von STM LT2 begannen die Klone nach 11 Tagen den Scatterphänotyp zu bilden und es konnten bis einschließlich Tag 16 insgesamt 30 LT2 Scatterklone isoliert werden. Auf der STM LT2 Wildtypkontrollplatte mit insgesamt 378 Kolonien scatteten < 1% der Kolonien, was für den Versuch nicht signifikant war und daher vernachlässigt wurde. Die STM SL1344 Klone zeigten den scatternden Phänotyp zeitlich eher als Stamm LT2. Hier konnten ebenfalls 30 SL1344 Scatterklone im Zeitraum von Tag 10 bis einschließlich Tag 16 isoliert werden (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Ergebnisse des Screens auf Suszeptibilität gegenüber Amöben der Transposon-mutagenisierten *Salmonella* Klonbänke. Insgesamt wurden 36.000 Tn5-STM Kolonien gescreent.

	Screen	
	STM LT2	STM SL1344
Tag der ersten Scatterkolonie	11	10
Tag der letzten Scatterkolonie	16	16
Tag scattern der negativ Kontrolle (Wildtyp)	11	-
Bezeichnung der Klone	LT2 sc 1, LT2 sc 2, usw.	SL1344 sc 1, SL1344 sc 2, usw.

In einem zweiten Screen (in Wernigerode) wurden keine weiteren Scatterklone selektiert, da von insgesamt ca. 9.000 Kolonien nur jeweils eine Kolonie pro STM Stamm den auffälligen Phänotyp zeigte, der zudem zeitgleich und in vergleichbarer Intensität mit dem Scattern einiger Wildtypkontrollkolonien auftrat. Der Amöbenscreen konnte nicht verifiziert werden, was möglicherweise dem Umzug des Labors von Berlin nach Wernigerode und den damit veränderten labor- und ressourcenspezifischen Bedingungen zugeschrieben werden könnte.

Mit dem „Screening“ der Transposon-mutagenisierten *Salmonella* Klonbänke im agarbasierten Amöbenscreen Verfahren wurden insgesamt rund 36.000 Tn5-STM Kolonien gescreent und es konnten insgesamt 60 Scatterklone, je 30 pro Stamm, mit charakteristischer

„strahlenförmiger“ Kolonimorphologie identifiziert werden. Die früh isolierten Scatterklone waren von besonderem Interesse, weil sie am ehesten den Phänotyp ausbildeten und dieses vermutlich auf einen starken Defekt in der Widerstandfähigkeit der Salmonellen in Interaktion mit den Amöben hindeutet. Im Weiteren wurde die SPI-1 Effektorproteinsekretion untersucht, um eine schnelle Priorisierung der weiter zu untersuchenden Mutanten vorzunehmen, da ein eventuelles Sekretionsdefizit auf eine Mutation im Virulenz-assoziierten Typ-III-Sekretionssystem deutet. Zeitgleich wurden die Insertionsorte der Transposons in den einzelnen Scatterklonen bestimmt, da den mutierten Genen eine entscheidende Rolle in der Salmonellen-Amöben-Interaktion zugeschrieben wurde.

4.1.4 Untersuchung der SPI-1 Effektorproteinsekretion der Scatterklone

Die Sekretion von Proteinen trägt zur Virulenz pathogener Bakterien bei. Bei Salmonellen sind die Effektorproteine, welche über das SPI-1 kodierte Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) transloziert werden, entscheidend am Virulenzverhalten beteiligt und können die Modulation des Aktin-Zytoskeletts für eine Internalisierung beeinflussen, sowie die zelluläre Abwehr des angeborenen Immunsystems stören [157].

Um zu untersuchen, ob die SPI-1 in einer der isolierten Mutanten durch Tn5-Insertion betroffen war, wurde in Zusammenarbeit mit Wiebke Streckel in allen 60 Scatterklonen und den jeweiligen Wildtypen mittels Western Blot Analyse die Sekretion der SPI-1 Effektoren SopA, SopB, SptP, SopD, AvrA, und SopE/ E2 über das T3SS in den Kulturüberstand überprüft. Die sekretierten Proteinmengen wurden mit Hilfe einer semiquantitativen Proteinbestimmung abgeschätzt [158]. Hierbei erfolgte eine Quantifizierung der Effektorproteine durch den Abgleich mit einer AvrA-Proteinverdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen. Diese wurden mit +++: ca. 80 - 120 µg/ ml Überstand; ++: ca. 50 - 80 µg/ ml Überstand; +: ca. 25-50 µg/ ml Überstand; (+): < 25 µg/ ml Überstand vereinfacht angegeben und ebenfalls für die Effektorproteine SopA, SptP, SopB, SopD und SopE/ E2 angewandt. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Bindungseffektivität der einzelnen polyklonalen Antikörper untereinander variiert und somit nur begrenzte Aussagen über die tatsächliche Effektorproteinmenge getroffen werden konnten. Für eine Diskriminierung der untersuchten Stämme bzw. Klone reichte diese aber aus. In Tabelle 4.3 ist die Auswertung der Effektorproteinsekretion aller 60 Scatterklone und entsprechender Wildtypen zusammenfassend dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 4.3: Nachweis der SPI-1 sekretierten Effektorproteine mittels Western Blot Analyse. Proteinkonzentrationen werden mit +++: ca. 80 - 120 µg/ ml Überstand; ++: ca. 50 - 80 µg/ ml Überstand; +: ca. 25 - 50 µg/ ml Überstand; (+): < 25 µg/ ml Überstand vereinfacht angegeben. Die Werte repräsentieren Ergebnisse aus zwei unabhängigen Analysen.

Stamm	SopB	AvrA	SptP	SopD	SopA	SopE	SopE2
LT2 WT	+++	++	+++	+++	++	-	++
LT2 sc 1	+++	+++	+++	+++	+++	-	(+)
LT2 sc 2	+++	+++	+++	+++	+	-	++
LT2 sc 3	+++	+++	+++	+++	+++	-	+
LT2 sc 4	+++	++	+++	+++	++	-	+
LT2 sc 5	+++	++	+++	+++	++	-	+
LT2 sc 6	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
LT2 sc 7	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 8	+++	+++	+++	++	++	-	(+)
LT2 sc 9	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
LT2 sc 10	+++	+++	+++	+++	++	-	+
LT2 sc 11	+++	++	+++	++	+++	-	++
LT2 sc 12	+++	++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 13	+++	+++	+++	+++	++	-	++
LT2 sc 14	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
LT2 sc 15	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 16	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
LT2 sc 17	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 18	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 19	++	+++	+	+++	+++	-	-
LT2 sc 20	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 21	+++	++	+++	++	++	-	+
LT2 sc 22	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 23	+++	+++	+++	++	+++	-	-
LT2 sc 24	+++	++	+++	+++	+++	-	-
LT2 sc 25	+++	+++	++	+++	+++	-	-
LT2 sc 26	+++	++	++	++	+++	-	-
LT2 sc 27	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
LT2 sc 28	+++	+++	+++	++	++	-	-
LT2 sc 29	+++	+++	+++	++	+++	-	+
LT2 sc 30	+++	+++	+++	++	++	-	+

Stamm	SopB	AvrA	SptP	SopD	SopA	SopE	SopE2
SL1344 WT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
SL1344 sc 1	++	+	+++	++	++	+++	++
SL1344 sc 2	+++	+	+++	++	+++	+++	-
SL1344 sc 3	++	+++	++	+++	++	++	-
SL1344 sc 4	+++	+	++	+	+++	++	-
SL1344 sc 5	+	++	++	+	+	+	-
SL1344 sc 6	+++	++	+++	++	+++	+++	-
SL1344 sc 7	+++	++	++	+	+++	+++	-
SL1344 sc 8	+++	++	+++	+	+++	+++	-
SL1344 sc 9	+++	++	++	+	++	++	-
SL1344 sc 10	+++	+	+++	+	++	+	-
SL1344 sc 11	+++	+	+++	++	++	++	-
SL1344 sc 12	+++	+	+++	+	++	++	+
SL1344 sc 13	+++	+	+++	+	+++	+++	-
SL1344 sc 14	+++	++	+++	+	+++	++	-
SL1344 sc 15	+++	++	+++	+	+++	++	-
SL1344 sc 16	+++	++	+++	+	+++	+++	-
SL1344 sc 17	+++	++	+++	+	+++	+++	-
SL1344 sc 18	+++	++	+++	+	+++	+++	-
SL1344 sc 19	+++	++	+++	+	++	+++	-
SL1344 sc 20	+++	++	+++	+	++	++	-
SL1344 sc 21	+++	+	+++	+	++	++	-
SL1344 sc 22	+++	+	+++	+++	+++	+++	-
SL1344 sc 23	+++	+	+++	+++	+++	++	-
SL1344 sc 24	+++	+	+++	+++	++	+	-
SL1344 sc 25	+++	+	+++	+++	+++	+	-
SL1344 sc 26	+++	++	+++	+++	+++	+++	-
SL1344 sc 27	+++	+	++	++	++	++	-
SL1344 sc 28	++	+++	++	++	+++	+	-
SL1344 sc 29	+++	-	+	++	++	-	-
SL1344 sc 30	+++	-	+	++	++	-	-

ERGEBNISSE

Der Stamm LT2 trägt das *sopE2* Gen, *sopE* ist aber nicht vorhanden [98]. SopE2 besitzt 69% Sequenzhomologie zu SopE [89], wodurch eine verringerte Bindungsaffinität des polyklonalen Antikörpers zu erklären ist und daher möglicherweise auch eine putativ vorhandene SopE2 Sekretion in den Kulturüberstand nicht oder schlecht detektiert werden konnte. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde der SopE/ SopE2 Nachweis vernachlässigt betrachtet. Ansonsten war die Sekretion der SPI-1 Effektoren in den Klonen sehr homogen. Insbesondere die frühen Scatterklone zeigten reproduzierbar keine wesentlichen Veränderungen im Nachweis der sekretierten *Salmonella outer proteins*.

Die Sekretion der SPI-1 Effektoren war generell nicht ausgeschaltet, was zeigte, dass das SPI-1 kodierte T3SS bei keinem Klon durch die Transposoninsertion inaktiviert wurde. Mit Hilfe dieser Sekretionsanalyse konnte einzelnen Scatterklonen keine besondere Wichtigkeit zugeordnet werden, weshalb die Priorisierung der weiter zu untersuchenden Mutanten durch die Bestimmung der Transposonlokalisation im *Salmonella* Genom vorgenommen werden sollte.

4.1.5 Tn5-Lokalisation in den STM Transposon-Mutanten

Durch die Bestimmung der Insertionsorte des Tn5-Transposons im *Salmonella* Genom, sollten die mutierten Gene identifiziert werden, die für die Interaktion von Salmonellen mit Amöben putativ von Bedeutung sind. Es wurde erwartet bereits bekannte Virulenzgene zu finden und neue Gene zu identifizieren, die eine Priorisierung der weiter zu untersuchenden Mutanten zulassen sollte.

Der Ort der Transposoninsertion im *Salmonella* Genom wurde mit Hilfe von inverser PCR [154] und anschließender Sequenzierung bestimmt. Die genauen Insertionsorte für STM LT2 sind durch BLAST-Analysen an der Genomsequenz von STM LT2 [156], hinterlegt in der Genomdatenbank NCBI (NC_003197.1 bzw. NC_003277 für LT2 pLST) recherchiert worden. Entsprechend wurden die Tn5-Insertionsorte für STM SL1344 an der vom Sanger Institut veröffentlichten Genomsequenz von STM SL1344 NCTC 13347 bestimmt.

Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über alle identifizierten Gene, in bzw. vor welche das Transposon insertiert ist und die somit von der Tn5-Insertion betroffen sind.

ERGEBNISSE

Tabelle 4.4: Lokalisation des Tn5-Transposons in den einzelnen STM Scatterklonen. Die Scatterklone (sc), deren Tn5-Insertionsort nicht eindeutig bestimmt werden konnte sind mit einem „n. b.“ und sc deren Tn5-Insertionsort nicht verifiziert werden konnte mit einem „*“ gekennzeichnet. Die genauen Tn5-Insertionsorte sind für STM LT2 an der Genomsequenz hinterlegt in der Genomdatenbank NCBI (NC_003197.1 bzw. NC_003277 für LT2 pLST) recherchiert worden. Für STM SL1344 wurden die Tn5-Insertionsorte an der vom Sanger Institut veröffentlichten Genomsequenz von STM SL1344 NCTC 13347 bestimmt. Bereits publizierte Virulenzgene sind „fett“ hervorgehoben.

LT2 sc	locus tag	Gen	Insertionsort	Proteinannotation	gi	Amplifikat im WT [bp]
	intergenisch					
1	<i>STM3005</i>	<i>mutH</i>	3163197	DNA mismatch repair protein	16766307	1028
	<i>STM3004.In</i>	<i>STM3004.In</i>		hypothetical protein	39980858	1028
2	<i>STM2901</i>	<i>STM2901</i>	3045539	hypothetical protein	16766207	420
3	<i>STM4175</i>	<i>purD</i>	4392278	Phosphoribosylamine-glycine ligase	16767429	1743
4	<i>STM1129</i>	<i>nanE1</i>	12178402	N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	16764486	666
5	<i>STM4575</i>	<i>STM4575</i>	4830870	putative outer membrane protein	16767816	649
6*	<i>STM1057</i>	<i>pepN</i>	1146690	aminopeptidase N	16764416	2601
7	n.b.	-	-	-	-	-
8*	intergenisch downstream <i>PSLT020.IN</i>	<i>PSLT020.IN</i>	16613 (PSLT)	-	-	-
	<i>repA2</i>	<i>PSLT023</i>		DNA replication protein	17233485	
9	<i>STM4595</i>	<i>STM4595</i>	4853269	putative fimbrial chaperone	16767836	546
10*	<i>STM4595</i>	<i>STM4595</i>	4853269	putative fimbrial chaperone	16767836	546
11	<i>STM1699</i>	<i>ycjE</i>	1791882	putative cytoplasmic protein	16765043	754
12	<i>STM3636</i>	<i>lpfE</i>	3822731	long polar fimbrial minor protein	16766922	487
13*	<i>STM2153</i>	<i>yehE</i>	2248187	outer membrane protein	16765482	822
14	<i>STM3962</i>	<i>yigL</i>	4167552	putative sugar phosphatase	16767232	801
15	<i>STM0014</i>	<i>STM0014</i>	15583	putative transcriptional regulator	16763404	945
16*	<i>STM1129</i>	<i>nanE1</i>	1218892	N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	16764486	666
17	<i>STM4424.S</i>	<i>STM4424.S</i>	4667646	putative endonuclease	39546400	999
18	<i>STM2672</i>	<i>yfiN</i>	2814379	hypothetical protein	16765987	477
19	<i>STM1517</i>	<i>ydeD</i>	1595879	O-acetylserine/ cysteine export protein	16764862	1353
20	n.b.	-	-	-	-	-
21*	<i>STM4195</i>	<i>STM4195</i>	4417571	Putative Na ⁺ -dependent transporter	16767445	932
22	<i>STM4426</i>	<i>srfJ</i>	4668983	lysosomal glucosyl ceramidase-like protein	16767672	813
23	<i>pSLT095</i>	<i>traN</i>	75392	conjugal transfer mating pair stabilization protein TraN	17233459	1827
24	<i>STM3567</i>	<i>livJ</i>	3734866	high-affinity branched-chain amino acid transporter	16766853	1098
25	<i>STM1129</i>	<i>nanE1</i>	1218891	N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	16419645	666
26*	<i>STM4127</i>	<i>yijC</i>	4345926	DNA-binding transcriptional repressor FabR	16767391	636
27	<i>STM4419</i>	<i>STM4419</i>	4662139	sugar transporter	16767665	1437
28	n.b.	-	-	-	-	-
29	<i>STM2414</i>	<i>yfeD</i>	2529954	putative negative regulator	16765738	393
30	<i>STM3126</i>	<i>STM3126</i>	3287008	amino acid transporter	16766426	402

ERGEBNISSE

SL1344 sc	locus tag	Gen	Insertions- ort	Proteinannotation	gi	Amplifikat im WT [bp]
1	<i>STM1442</i>	<i>ydhJ</i>	1475954	putative multidrug resistance efflux pump	16764789	897
2	<i>STM1057</i>	<i>allD</i>	589633	ureidoglycolate dehydrogenase	16763908	1369
3	<i>STM2080</i>	<i>udg</i>	2155869	UDP-glucose/ GDP- mannose dehydrogenase	16765410	1150
4	n.b.	-	-	-	-	-
5	n.b.	-	-	-	-	-
6*	<i>STM0438</i>	<i>STM0438</i>	491956	TPR repeat-containing protein	16763819	1283
7	<i>STM4018</i>	<i>yihP</i>	4249662	GPH family transport protein	16767283	1366
8	n.b.	-	-	-	-	-
9	n.b.	-	-	-	-	-
10	<i>STM1897</i>	<i>yebB</i>	1950389	hypothetical protein	16765239	599
11	<i>STM1353</i>	<i>ydiR</i>	1391266	ydiR electron transfer flavoprotein subunit YdiR	16419873	344
12	<i>STM3601</i>	<i>STM3601</i>	3794732	putative phosphosugar isomerase	16422163	378
13	<i>STM3197</i>	<i>glgS</i>	3380160	glycogen synthesis protein GlgS	16766497	210
14	<i>STM1297</i>	<i>selD</i>	1332494	selenophosphate synthetase	16764648	509
15*	<i>STM2742</i>	<i>STM2742</i>	2903347	putative cytoplasmic protein	16421288	675
16*	<i>STM4086</i>	<i>glpK</i>	4315902	glycerol kinase	16767352	507
17	n.b.	-	-	-	-	-
18*	<i>STM1764</i>	<i>narG</i>	1816003	nitrat reductase 1 alpha subunit	16765105	935
19	n.b.	-	-	-	-	-
20	n.b.	-	-	-	-	-
21	n.b.	-	-	-	-	-
22	n.b.	-	-	-	-	-
23	intergenisch <i>R64_p130</i>	<i>pilL</i>	32 bp vor <i>pilL</i>	lipoprotein	32470262	375
24	n.b.	-	-	-	-	-
25*	<i>STM1764</i>	<i>narG</i>	1816729	nitrat reductase 1 alpha subunit	16765105	935
26*	<i>STM1764</i>	<i>narG</i>	1816729	nitrat reductase 1 alpha subunit	16765105	935
27	intergenisch <i>STM1663</i> <i>STM1662</i>	<i>ynaI</i> <i>ynaJ</i>	1713586	integral membrane protein inner membrane protein	16765007 16765006	498 498
28	<i>STM0529</i>	<i>fdrA</i>	592210	membrane protein FdrA	16763909	1665
29*	<i>STM3264</i>	<i>yraM</i>	3434426	putative transglycosylase	16766562	2043
30	<i>STM3501</i>	<i>envZ</i>	3680503	osmolarity sensor protein	16766789	351

Um die jeweiligen Transposonlokalisationen zu bestätigen, wurden Oligonukleotidpaare konstruiert die flankierend zu den ermittelten Insertionsorten lagen (Tab. M 2.12). Somit konnte mittels PCR und anschließender Elektrophorese durch „Shift-Analyse“ eine schnelle Verifizierung der Transposonlokalisation stattfinden. Die jeweiligen WT-Amplifikatgrößen sind in Tabelle 4.4 angegeben. Ist das Transposon an der ermittelten Stelle inseriert, ergab sich ein „shift“ der DNA-Bande um +1200bp im Scatterklon. Bei den jeweils 30 Scatterklonen pro STM Stamm konnte so der genaue Transposoninsertionsort von insgesamt 20 STM LT2 und 13 STM SL1344 Scatterklonen verifiziert werden.

ERGEBNISSE

Die Analyse der Tn5-Lokalisation zeigte, dass sowohl bekannte Virulenzgene als auch Gene, die bisher nicht als Virulenzfaktoren beschrieben wurden, gefunden wurden. Diese Gene mit potenzieller metabolischer, Chaperon-, Transport-, oder hypothetischer Funktion könnten wichtig für die Interaktion mit Amöben sein. Wie auch die SPI-1 Effektorproteinsekretionsanalyse zeigte, sind keine SPI-1 Gene, die das T3SS kodieren, durch eine Transposoninsertion betroffen (4.1.4). Interessanterweise wurde auch keine Mutante mit einem defekten Gen der SPI-2 gefunden, obwohl die SPI-1 und SPI-2 kodierten Sekretionssysteme bei *Salmonella* als Hauptvirulenzfaktoren gelten, die Virulenz-assoziierte Effektoren in die Wirtszellen translozieren und entscheidend am intrazellulären Überleben beteiligt sind.

Mit der Bestimmung der Transposoninsertionsorte konnte kein einzelner Scatterklon besonders priorisiert werden. Im Folgenden wurden deshalb alle 60 Scatterklone in verschiedenen Infektionsmodellen getestet, um eine Auswahl der näher zu untersuchenden Klone bzw. Gene vorzunehmen.

4.2 Testung der Scatterklone in verschiedenen Infektionsmodellen

Grundlegend wurde vermutet, dass der *Salmonella* Scatterphänotyp, wie für *Legionella* gezeigt, ein Resultat des Resistenzverlustes der Bakterien gegenüber Amöben ist. Um zu testen, ob die Mutationen in den Scatterklonen (sc) zudem Auswirkung auf das Virulenzverhalten in unterschiedlichen Zelllinien zeigen, wurden diese in verschiedenen Infektionsmodellen untersucht. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der agarbasierte Screen bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, die Infektionsuntersuchungen aber bei 37°C vollzogen wurden.

Zunächst wurde über das Wachstumsverhalten in LB-Medium kontrolliert, ob die Transposoninsertionen in den Scatterklonen physiologische Auswirkungen zeigten. Von besonderem Interesse waren die frühen Scatterklone (sc 1 bis 5), weil die zeitige Ausbildung des Phänotyps auf ein starkes Defizit in der Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben schließen ließ. Exemplarisch für die Mutanten STM LT2 sc 2 und 3 ist aus Abbildung 4.3 zu entnehmen, dass sich die Scatterklone, in ihrer Vermehrungsfähigkeit in LB-Kulturmedium entsprechend dem Wildtyp verhielten. Alle Stämme replizierten sich ungeachtet ihrer

ERGEBNISSE

Mutation während der frühen- (lag-) und mittleren- (log-) Wachstumsphasen in gleichem Verhältnis und gingen nach ca. 8h Wachstum in die stationäre Phase über, wo ihr Wachstum stagnierte.

Für die Infektionsversuche war der Scatterklon STM LT2 sc 3 = *purD::Tn5* von besonderem Interesse. Dieser Klon wurde im Screen, durch Ausbildung des Scatterphänotyps gefunden und zeigte somit eine verminderte Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben. Additiv hierzu ist eine bereits beschriebene auxotrophe *purD* Mutante in ihrer Infektivität gegenüber Makrophagen verringert [159]. Dies könnte ein Beispiel dafür sein, dass auch bei Salmonellen gleiche Gene in der Makrophageninfektion und in der Interaktion mit Amöben involviert und von Bedeutung sind, wie für Legionellen gezeigt [152].

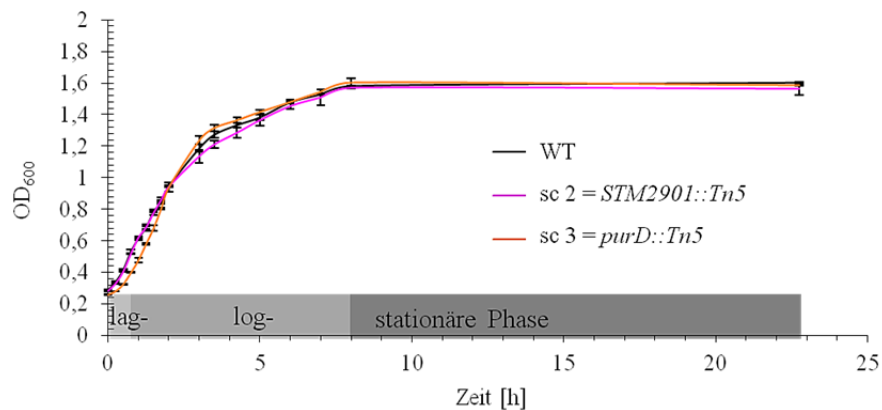


Abbildung 4.3: Wachstumsverhalten von STM LT2 Wildtyp und frühen Scatterklonen in LB-Medium. Das Wachstumsverhalten wird exemplarisch für den STM LT2 Wildtyp und die Scatterklone (sc) 2 = *STM2901::Tn5* und sc 3 = *purD::Tn5* gezeigt. Alle Stämme zeigten gleiches Replikationsverhalten in der lag- und log- Wachstumsphase und gingen nach ca. 8h Wachstum in die stationäre Phase über. Die Daten repräsentieren Triplikate aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, wie sich etablierte virulenzdefekte Mutanten und die *Salmonella* Scatterklone unter den gewählten Bedingungen in verschiedenen Infektionsmodellen verhalten.

4.2.1 Infektion nicht-phagozytierender Zellen mit *Salmonella*

Im folgenden Infektionsmodell wurde untersucht, ob die identifizierten Scatterklone additiv zu einem Verlust der Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben auch in nicht-phagozytierenden HeLa-Epithelzellen Veränderungen, vorwiegend Invasionsdefizite, im Infektionsverhalten im Vergleich zum Wildtypstamm aufweisen. Zur Etablierung der

ERGEBNISSE

Infektion wurde zunächst mit dem STM 14028 WT und zwei etablierten Virulenzmutanten gearbeitet, um möglichst optimale Versuchsbedingungen zu finden. Der Stamm STM 14028 MvP818 trägt eine $\Delta invC$ Mutation. Durch die Deletion des Gens wird die, als Energielieferant für das SPI-1 kodierte T3SS dienende und an der inneren Membran lokalisierte, ATPase InvC inaktiviert [160]. Auf Grund dessen hat der Stamm einen nachweislichen Invasionsdefekt in nicht-phagozytierende Zellen [161]. Die $\Delta invC$ Mutation vermindert die Invasivität eines *Salmonella* Stammes zwar stark, jedoch wird sie nicht völlig unterbunden, da vermutlich ein alternativer Invasionsweg genutzt wird [162]. Bei der zweiten Mutante, Stamm STM 14028 P2D6, mit einem deletierten $\Delta ssaV$ Gen wird durch die Mutation die SPI-2 kodierte Typ-III-Sekretion gestört und somit ein Replikationsdefekt in verschiedenen Infektionsmodellen hervorgerufen, wie beispielweise in Makrophagen [163].

In Vorversuchen wurden verschiedene MOI's (1, 10 und 100) getestet, um möglichst optimale Infektionsraten zu erzielen. Bei Infektionen mit einer MOI 1 war die Invasion nach 2h generell gering und es konnten während der Infektion über 24h keine Kolonien (*cfu/ml*) der $\Delta invC$ Mutante auf LB-Agarplatten nachgewiesen werden. Dadurch fehlt für putativ invasionsdefiziente Klone ein Referenzstamm (Abb. 4.4, MOI 1). Die Infektion mit MOI 10 zeigte hingegen eine höhere Invasionsrate und signifikante Unterschiede im Infektionsverhalten der getesteten STM Stämme. Der STM 14028 WT replizierte sich intrazellulär über 24h um zwei log-Stufen. Die isogene Mutante $\Delta invC$ zeigte einen deutlichen Invasionsdefekt und die Mutante $\Delta ssaV$ wies eine verminderte Replikation von ca. $\frac{1}{2}$ log-Stufe über 24h Infektionsdauer auf (Abb. 4.4, MOI 10).

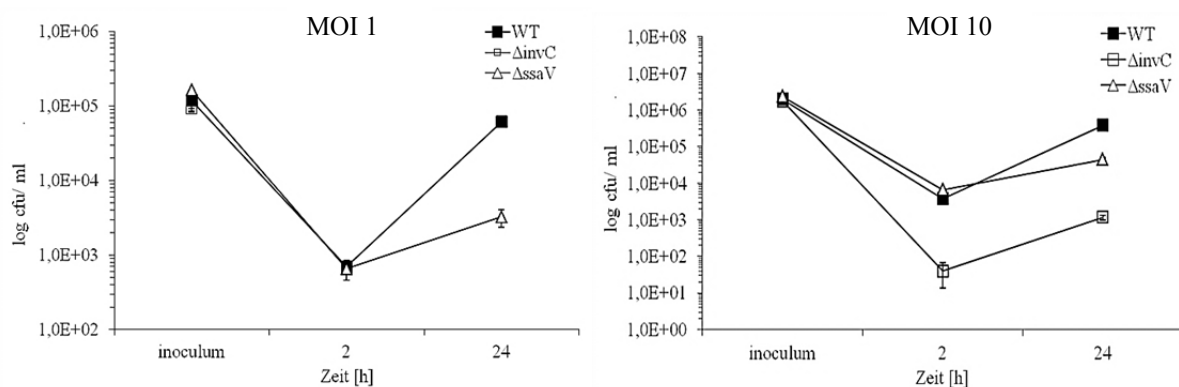


Abbildung 4.4: HeLa-Infektion mit etablierten STM 14028 virulenzdefekten Mutanten. Die Epithelzellen wurden mit einer MOI 1 oder 10 infiziert. Die Infektion mit MOI 1 zeigte generell eine geringe Invasionsrate, wobei die invasiondefizite $\Delta invC$ Mutante nicht per *cfu*-Bestimmung erfasst werden konnte. Die Infektion mit MOI 10 zeigte signifikante Unterschiede im Infektionsverhalten der etablierten Mutanten im Vergleich zum WT 14028. Im Gegensatz zum WT, welcher sich intrazellulär replizierte, war die $\Delta ssaV$ Mutante deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit vermindert und die $\Delta invC$ Mutante zeigte den erwarteten Invasionsdefekt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

ERGEBNISSE

Die Infektionen mit einer MOI 100 waren, durch die Notwendigkeit von höheren Verdünnungen, aufwendiger und lieferten ähnliche Infektionsergebnisse wie Infektionen mit MOI 10 (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für HeLa-Infektionen die MOI 10 favorisiert und für alle weiteren Versuch genutzt.

Nachdem die HeLa-Infektion etabliert wurde, wurden alle 60 Scatterklone im Vergleich zu dem jeweiligen Wildtyp mit den optimierten Bedingungen, mit einer MOI 10 wie unter 3.4.3 beschrieben, in der Epithelzellinfektion auf ein verändertes Invasions- oder Replikationsverhalten getestet. Hierbei zeigten insgesamt 59 Klone keine Attenuation in Invasion und/oder Replikation bei den gewählten Testbedingungen. Einzige Ausnahme war der STM LT2 sc 3 = *purD::Tn5*. Dieser Klon invadierte in die Epithelzellen in gleichem Maße wie der Wildtyp, zeigte aber signifikante Unterschiede in der Replikationsfähigkeit. Die purinauxotrophe Mutante war somit wie erwartet nicht in der Lage sich intrazellulär zu vermehren. Während der Infektion über 24h war eine nahezu gleichbleibende intrazelluläre Zellzahl zu beobachten, was lediglich ein Überleben der Bakterien in den Zellen zeigte (Abb. 4.5)

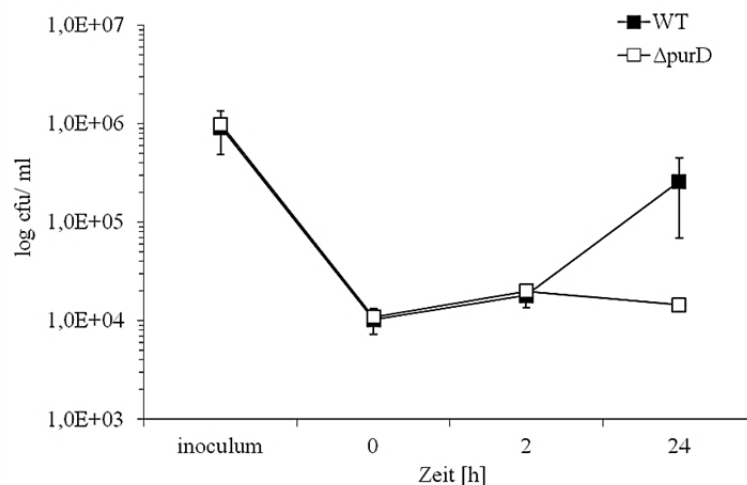


Abbildung 4.5: HeLa-Infektion mit STM LT2 WT und sc 3 = *purD::Tn5*. Die HeLa-Zellen wurden mit einer MOI 10 infiziert. STM LT2 WT und der Scatterklon 3 zeigten eine vergleichbare Invasion in die Zielzellen. Über 24h Infektionsdauer zeigte der STM LT2 sc 3 = *purD::Tn5* einen erwarteten Replikationsdefekt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Mit Hilfe des HeLa-Infektionsmodells konnte bei etablierten virulenzdefizienten Mutanten ein bereits beschriebener Virulenzdefekt nachgewiesen werden. Da in diesem Infektionsmodell aber 98,3% der Scatterklone kein verändertes Infektionsverhalten im Vergleich zu den Wildtypen zeigten, sollten die Virulenzeigenschaften der Scatterklone zusätzlich im Makrophagenmodell getestet werden.

4.2.2 Infektion phagozytierender Zellen mit *Salmonella*

Die Fähigkeit von *Salmonella* Serovaren in Makrophagen-Zellen einzudringen, zu überleben und sich innerhalb zu replizieren, spielt eine wichtige Rolle in der Virulenz dieser Pathogene [164-167]. Im U937-Infektionsmodell wurde daher getestet, ob die Mutationen in den Scatterklonen Auswirkungen auf das Virulenzverhalten, vorwiegend der Replikationsfähigkeit, in einer humanen Makrophagenzelllinie zeigen. Dazu wurden humane U937-Makrophagen mit allen 60 *Salmonella* Scatterklonen im Vergleich zum jeweiligen Wildtypstamm infiziert.

Zunächst galt es auch hier die Versuchsbedingungen zu optimieren und ein Makrophagenmodell zu etablieren. Dazu wurden in Vorversuchen, wie zuvor für die Epithelzellinfektion beschrieben, verschiedene MOI's, wie MOI 10 und 100 getestet und zunächst mit den 3,5h subkultivierten Stämmen STM 14028, isogener $\Delta invC$ - und $\Delta ssaV$ -Mutante infiziert. Beide Bedingungen lieferten vergleichbare Ergebnisse, doch auf Grund der weniger aufwendigen Versuchsdurchführung (weniger Verdünnungen) für die MOI 10 wurde diese favorisiert. Abbildung 4.6 zeigt das unterschiedliche Infektionsverhalten der getesteten Stämme bei einer MOI 10. Alle Stämme waren nach 2h Infektionszeit von den Makrophagen aufgenommen worden, wobei die $\Delta invC$ -Mutante eine verminderte Invasion erkennen ließ. Diese invasionsdefekte Mutante wurde nur passiv durch Makrophagenphagozytose aufgenommen, wohingegen der WT und die $\Delta ssaV$ -Mutante zusätzlich noch aktiv invadieren konnten und eine höhere Aufnahme zustande kam.

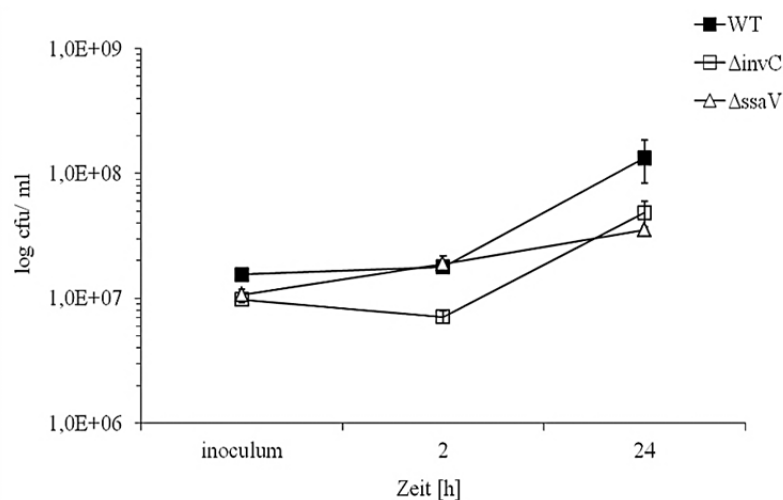


Abbildung 4.6: U937-Infektion mit etablierten STM 14028 virulenzdefekten Mutanten. Die Makrophagen wurden mit einer MOI 10 infiziert. Die Infektion zeigte signifikante Unterschiede im Infektionsverhalten der etablierten Mutanten im Vergleich zum WT. Im Gegensatz zum WT, welcher sich intrazellulär replizierte, war die $\Delta ssaV$ -Mutante deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit vermindert und die $\Delta invC$ -Mutante zeigte einen leichten Invasionsdefekt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

ERGEBNISSE

Nach der Methodenetablierung wurden alle 60 Scatterklone vergleichend zu ihren Wildtypen, wie unter 3.4.2 beschrieben in die U937 Infektion eingesetzt. Exemplarisch wird hier die Infektion des STM LT2 WT und STM LT2 sc 3 = *purD::Tn5* gezeigt. Wie in der Epithelzellinfektion, zeigte auch hier der Scatterklon mit $\Delta purD$ eine attenuierte intrazelluläre Replikation (Abb. 4.7).

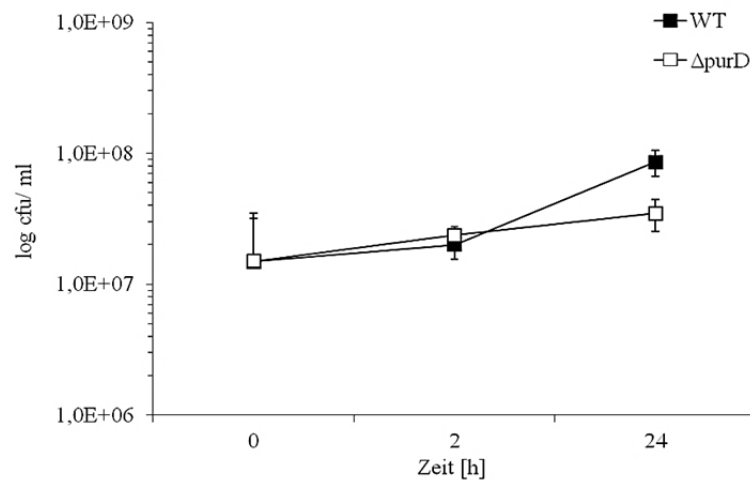


Abbildung 4.7: U937-Infektion mit STM LT2 WT und sc 3 = *purD::Tn5*. Die Makrophagen wurden mit einer MOI 10 infiziert. Der STM LT2 WT und der Scatterklon zeigten eine vergleichbare Invasion in die Zielzellen. Über 24h Infektionsdauer zeigte der STM LT2 sc 3 = *purD::Tn5* einen erwarteten Replikationsdefekt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Mit Ausnahme dieser STM LT2 *purD::Tn5* Mutante, zeigten die weiteren 59 Scatterklone keinen attenuierten Phänotyp in der U937-Infektion, deren intrazelluläre Replikationsfähigkeit war vergleichbar mit der des Wildtypstammes.

Wie Studien anderer Arbeitsgruppen aber zeigen scheint die intrazelluläre Persistenz und Vermehrungsfähigkeit von STM in Makrophagen eine wirtsspezifische Komponente zu haben [166, 168, 169]. Salmonellen verhalten sich unterschiedlich in Makrophagen, je nach deren Herkunft. Daher wurden einige ausgewählte Scatterklone zusätzlich in RAW-Makrophagen (Maus-Makrophagen-Zelllinie) getestet. Hierbei wurden hauptsächlich die frühen Klone verwendet, die einen stärkeren Virulenz-assoziierten Defekt vermuten ließen als die späteren Klone, da sie am ehesten den Phänotyp in der Amöbeninteraktion ausbildeten. Die Infektion erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben mit einer MOI 5, da es bei höheren MOI's auf Grund der stärkeren intrazellulären Replikation der Bakterien in dieser Zelllinie zur Lyse der RAW-Zellen kommen könnte (mündl. Dr. R. Gerlach, RKI Wernigerode).

ERGEBNISSE

Die *purD::Tn5* Mutante (STM LT2 sc 3) zeigte einen sehr deutlichen Replikationsdefekt während der Infektion über 24h und war aufgrund der Mutation nicht zum intrazellulären Überleben befähigt. Alle weiteren untersuchten Klone verhielten sich in der RAW-Infektion äquivalent zum Wildtyp bzgl. der Invasions- und Replikationsfähigkeit (Abb. 4.8).

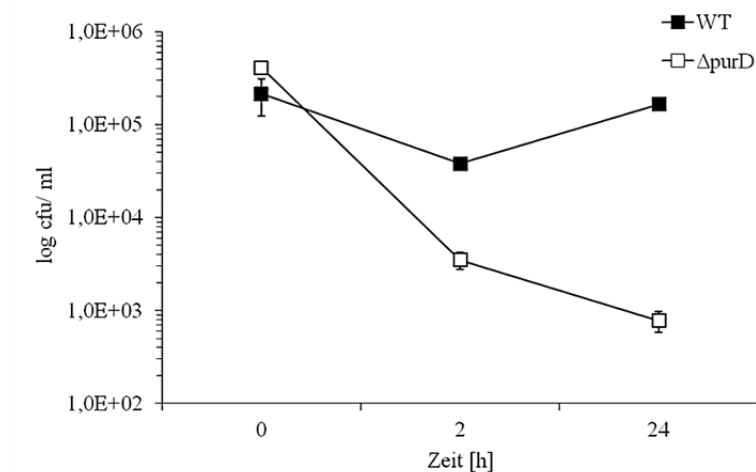


Abbildung 4.8: RAW-Infektion mit STM LT2 WT und sc 3 = *purD::Tn5*. Die Makrophagen wurden mit einer MOI 5 infiziert. Die Scattermutante LT2 sc 3 = *purD::Tn5* zeigte einen erwarteten Replikationsdefekt nach 24h Infektionsdauer. Die Daten repräsentieren Doppelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die im Screen auf Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben selektierten amöbensensitiven Klone in der Regel im quantitativen Epithelzellmodell, sowie in humanen und Mausmakrophagen, mit Ausnahme von Scatterklon 3 des Stammes STM LT2, uneingeschränkt invadierten und sich intrazellulär replizierten. Die *purD::Tn5* Mutation des STM LT2 sc 3 führte zu einer attenuierten intrazellulären Replikation in etablierten Infektionsmodellen, was hier bestätigt und quantifiziert werden konnte. Die Virulenzmutanten STM 14028 MvP818 ($\Delta invC$) und STM 14028 P2D6 ($\Delta ssaV$), welche als Kontrollen mitgeführt wurden, zeigten ebenfalls die erwarteten Virulenzdefekte in den beschriebenen Infektionsmodellen (Daten z. T. nicht gezeigt).

Im Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben schienen die *Salmonella* Scatterklone, wie für Legionellen gezeigt, weniger widerstandsfähig gegenüber Amöben zu sein. Die Untersuchungen in den weiteren verschiedenen Säugertierinfektionsmodellen zeigten aber keine Attenuation in der Kolonisierung und der intrazellulären Replikation anderer Wirtszellen. Daher sollte die Hypothese einer Suszeptibilität der Scatterklone gegenüber Amöben anschließend im Amöbeninfektionsmodell evaluiert werden.

4.3 Etablierung eines Amöbeninfektionsmodells

Mehrere Studien berichten über eine funktionelle Infektion von Amöben mit Salmonellen und der Fähigkeit des Pathogens intrazellulär in Protozoen zu überleben und sich zu replizieren [17, 19]. Um einen Zusammenhang zwischen den von der Transposoninsertion betroffenen Genen der Scatterklone und der Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben zu belegen, sollte ein Amöbeninfektionsmodell etabliert und überprüft werden, ob die Mutanten tatsächlich attenuiert sind. Dazu wurden zunächst verschiedene Versuchsbedingungen getestet (s. Tabelle 4.5), um eine Auswertung der Infektion über *cfu*-Bestimmung durchzuführen, da diese Methode bereits erfolgreich bei Amöbeninfektionen mit Salmonellen eingesetzt wurde [19].

Tabelle 4.5: Versuchsbedingungen zur Etablierung eines Amöbeninfektionsmodells

	getestete Versuchsbedingungen	verwendete Infektionsbedingung
Kultivierung	ü. N., 37°C, 150 rpm, longitudinal; round; anschließende Subkultivierung im Roler Drum für 3,5h	ü. N., 37°C, 150 rpm, round und 3,5h Subkultur im Roler Drum, 37°C
MOI	0,01; 0,1; 1; 10; 100	10
Infektionstemperatur	18°C; 25°C; 37°C	37°C
Waschmedium	1×PBS; Infektionsmedium	1×PBS
Lyseverfahren	Eiskaltes bidest. H ₂ O; RT-warmes bidest. H ₂ O; 1×PBS; Triton X-100; Desoxychelät; mit/ ohne Auf- und Abpipettieren mit Kanüle oder versch. Pipettenspitzen	0,1% Desoxychelät in 1×PBS und 10maliges Auf- und Abpipettieren mit 1ml Pipettenspitze
Infektionsmedium	Leitungswasser (Berlin); Leitungswasser (Wernigerode); Infektionsmedium; PYG-Medium; 1×PBS	Leitungswasser (Berlin) und Infektionsmedium
Invasionszeit	30min, 1h, 2h, 3h, 24h	definierte Zeitpunkte (1h - 20h)
Antibiotikabehandlung	mit/ ohne Gentamicin	mit Gentamicinbehandlung und Mediumswechsel
Waschschritte	mit/ ohne Waschung; Waschung im Infektionswell; Waschung in separatem Reaktionsgefäß	mit Waschung im Infektionswell
Amöben	<i>A. castellanii</i> Stamm ATCC; <i>A. castellanii</i> Stamm NEFF; <i>Hartmanella vermiformis</i> , <i>A. polyphaga</i>	<i>A. castellanii</i> Stamm ATCC

Die zur Infektion genutzten Salmonellen wurden mit unterschiedlichen Bedingungen kultiviert. Zudem wurden verschiedene MOI's untersucht, um eine optimale Invasionsrate zu erzielen. Eine weitere Möglichkeit die Aufnahme der Salmonellen seitens der Amöben zu begünstigen, war Stress zu induzieren und die Amöben vor der Infektion in nährstoffarmen Infektionsmedium bzw. Wasser „hungern“ zu lassen. Des Weiteren wurde die Infektion bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um die optimale Temperatur für die Co-Kultivierungsexperimente zu untersuchen. Die im Versuch protokollierten Waschschritte wurden mit verschiedenen Medien durchgeführt, was den physiologischen Stress für die

ERGEBNISSE

Amöben verringern sollte. Da die Amöben *A. castellanii* ATCC nicht sehr adhärent sind und sich bei Infektion, wie für Legionellen gezeigt, womöglich abrunden, wurde getestet, ob die Durchführung der Zentrifugationsschritte und Waschungen in separaten Reaktionsgefäßen den potentiellen Amöbenverlust minimiert. Ein weiterer Optimierungsversuch galt der Untersuchung unterschiedlicher Lyseverfahren, um sicherzustellen das alle intrazellulären Bakterien freigesetzt werden.

Letztlich erfolgte die Anzucht der Bakterien für die Infektion wie unter 3.1.1. beschrieben für 3,5h im Roler Drum, da hier eine erhöhte Expression der SPI-1 Effektoren zur verbesserten Aufnahme der Bakterien führen sollte. Die Analysen im Phasenkontrastmikroskop zeigten bei Infektionen mit $MOI < 10$ keine Interaktion mit Amöben und bei $MOI > 10$ eine sehr starke Vermehrung der Bakterien im Infektionsmedium (Daten nicht gezeigt), sodass die Infektion mit $MOI 10$ durchgeführt wurde. Die Hypothese, dass eine verstärkte Aufnahme der Bakterien durch die Amöben erfolgt, wenn diese „hungern“, konnte nicht bestätigt werden und wurde daher nicht angewandt. Die Infektion wurde schlussendlich bei 37°C durchgeführt, da hier die Amöben unversehrt waren, wohingegen bei den niedrigeren Temperaturen eine verstärkte Zystenbildung auftrat und/ oder die Amöben physiologisch nicht intakt waren. Durch das Umsetzen in separate Reaktionsgefäße wurde entgegen den Erwartungen ein starker Amöbenverlust verzeichnet, weshalb im Weiteren davon abgesehen und die Waschungen direkt im Infektions-*well* durchgeführt wurden. Aus den Testungen der unterschiedlichen Lyseverfahren resultierte, dass die Lyse mit 0,1% Desoxychelate in 1×PBS und durch 10maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1ml Pipettenspitze eine vollständige Lyse der Amöben zur Folge hatte, diese Methode wurde dann im Weiteren verwendet. Doch durch keine dieser Optimierungen war eine *cfu*-Bestimmung aus der Infektion von Amöben mit Salmonellen möglich, da keine Kolonien auf den Agarplatten wuchsen.

Um zu testen, ob Salmonellen grundsätzlich in der Lage sind Amöben unter den gewählten Bedingungen zu infizieren oder die fehlende Koloniebildung allein auf methodische Probleme zurückzuführen war, erfolgte eine mikroskopische Untersuchung.

Die Analyse putativ infizierter Amöben im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen ergab keine erkennbaren Unterschiede im Phasenkontrastmikroskop (Daten nicht gezeigt). Um die Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen, wurde das Plasmid pFPV25.1 in die zu untersuchenden *Salmonella* Stämme transformiert (s. 3.7.3). Dieses Plasmid trägt *gfp* unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven STM *rpsM*-Promoters. *rpsM* ist das Gen für das ribosomale Protein S13 [170]. Der Promotor wurde gewählt, da dessen Expression in verschiedenen Umgebungen, einschließlich Wachstumsmedien und Säugerzellen in einem

ERGEBNISSE

vergleichbarem Niveau stattfindet [145]. Zunächst wurden die plasmidtragenden Stämme auf ihre Vermehrungsfähigkeit in Laborkultur überprüft und zusätzlich nach 0h, 4h und 24h Wachstum auf LB-Agarplatten ausplattiert. Weder das Wachstum in Flüssigmedium noch auf der Agarplatten (*cfu*/ ml) wurde durch das Plasmid pFPV25.1 beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

Im Hinblick auf die Etablierung der Amöbeninfektion wurde zunächst im etablierten U937 Makrophagenmodell getestet, ob das Infektionsverhalten der pFPV25.1-tragenden *Salmonella* Stämme mittels mikroskopischer Auswertung über Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden konnte. Dazu wurde in einem Vorversuch untersucht, ob das Plasmid in den Bakterien stabil war und auch bei einer Infektion in antibiotikafreiem Medium in den Salmonellen erhalten blieb. Hierzu wurde eine U937 Infektion, wie unter 3.4.2 beschrieben mit plasmidtragenden Stämmen durchgeführt, die Zellen fixiert und Bakterien mit dem primären Antikörper α -*Salmonella* LPS und sekundären Antikörper A594 immungefärbt. Die Infektion wurde nach 2h (Daten nicht gezeigt) sowie nach 24h (Abb. 4.9) ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Signale der GFP-Fluoreszenz (grün) mit der Immunfärbung (rot) übereinstimmen. Das pFPV25.1 Plasmid war demnach im STM LT2 WT und den Scatterklonen über die Zeit der Infektion stabil.

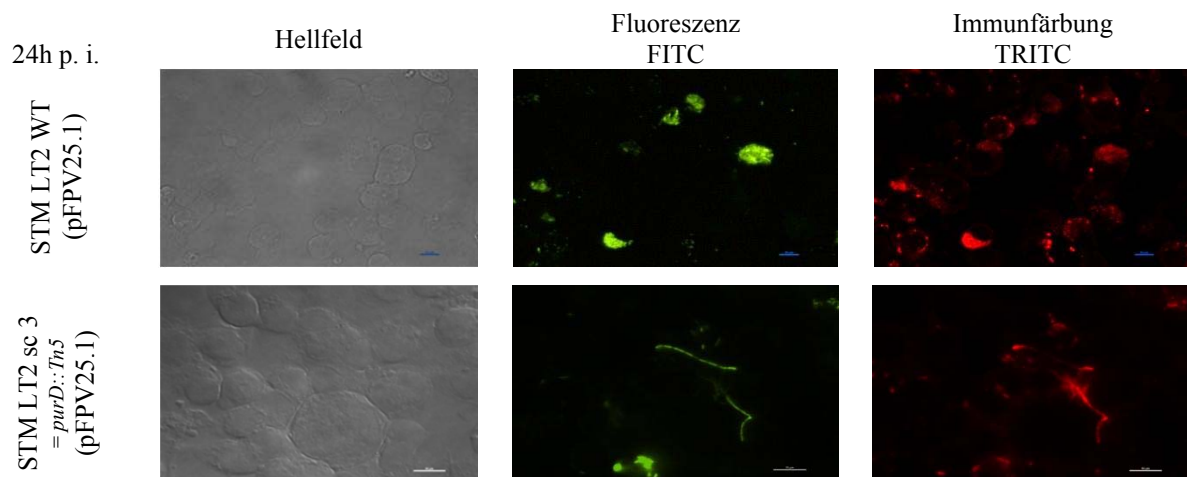


Abbildung 4.9: Makrophageninfektion mit *Salmonella* (pFPV25.1). Die U937-Zellen wurden mit einer MOI 10 mit dem STM LT2 WT (pFPV25.1) und der *purD::Tn5* Mutante LT2 sc 3 (pFPV25.1) infiziert und nach der Immunfärbung fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Die plasmidtragenden Bakterien exprimierten GFP und gaben ein grünes Signal. Die immungefärbten Bakterien lieferten ein rotes Signal. Bei beiden Stämmen traten die Fluoreszenzsignale von GFP (FITC) an gleicher Stelle zu dem Immunfärbungsnachweis (TRITC) auf. Somit war das Plasmid pFPV25.1 stabil in den Bakterien während der Infektion (für 24h). Scale bar 10µm. Vergrößerung 1000x. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Eine anschließende U937-Infektion konnte nun mikroskopisch mittels GFP-Fluoreszenzsignal ausgewertet werden. Verschiedene, willkürlich gewählte Ausschnitte, der auf Deckgläschen

ERGEBNISSE

fixierten Zellen, wurden unter dem Mikroskop betrachtet. Insgesamt wurden pro Stamm 400 bis 500 Makrophagen ausgezählt und davon der Anteil infizierter Zellen ermittelt. Wie in der *cfu*-Bestimmung, zeigte der STM WT Stamm auch mikroskopisch ein deutlich stärkeres Infektionsverhalten und wies nach 24h Infektionsdauer 21% infizierte Zellen auf, der Scatterklone STM LT2 sc 3 hingegen nur 6% (Abb. 6.10, C). Zudem war insbesondere beim Wildtyp eine intrazelluläre Vermehrung, vermutlich in SCV's (*Salmonella containing vacuoles*), erkennbar (Abb.4.10, A).

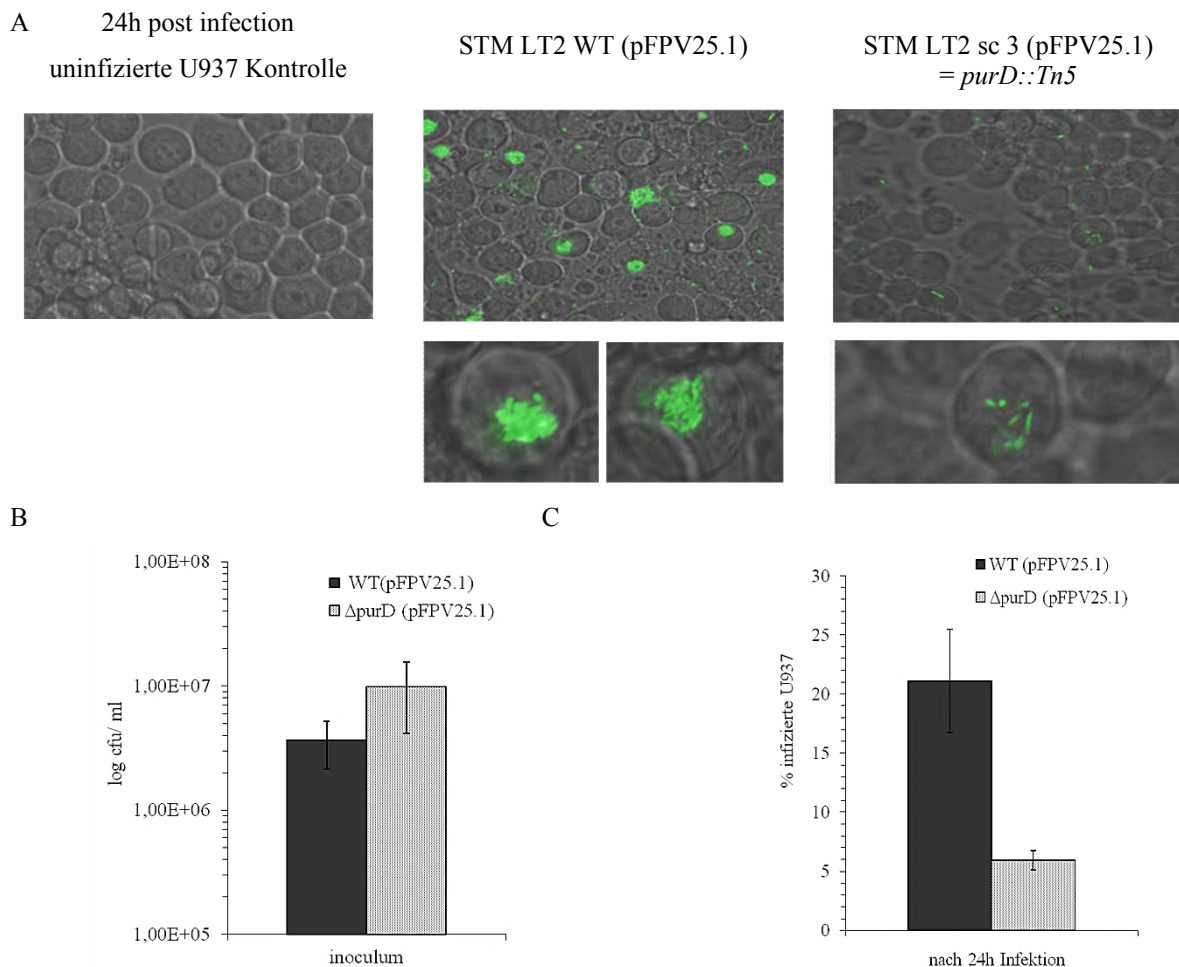


Abbildung 4.10: Mikroskopische Auswertung einer Makrophageninfektion mit *Salmonella* (pFPV25.1). Die Zellen wurden mit einer MOI 10 infiziert. **A:** Die mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte am cLSM 24h nach Infektion. Gezeigt sind die uninfizierte U937-Kontrolle, STM LT2 WT (pFPV25.1) und STM LT2 sc 3 = *purD::Tn5* (pFPV25.1) infizierte Zellen. Vergrößerung 1000x und teilweise Bildzoom (A). Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente. Die untere Reihe verdeutlicht eine intrazelluläre Replikation. **B:** Darstellung der für den Infektionsversuch verwendeten Bakterienanzahl. **C:** Die prozentuale Auswertung der infizierten U937 Zellen nach 24h Infektionsdauer. Die Daten repräsentieren zwei unabhängige Experimente.

Die Methode der mikroskopischen Auswertung einer Makrophageninfektion über Fluoreszenzmikroskopie wurde etabliert und zeigte erfolgreich Veränderungen im Infektionsverhalten verschiedener Stämme. Im Weiteren wurde diese Methode für das

ERGEBNISSE

Amöbenmodell angewandt, um das vermutete abgeschwächte Infektionsverhalten der Scatterklone zu überprüfen.

Erste Versuche die Amöbeninfektion über das GFP-Fluoreszenzsignal auszuwerten ließen keine infizierten Protozoen erkennen. Die Ergebnisse zeigten lediglich vereinzelte Bakterien die im Medium, nicht in direkter Assoziation mit Amöben auftraten (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss erfolgten weitere Optimierungen (s. Tab. 4.5). Zusätzlich zu den Modifikationen wie bereits zuvor aufgeführt, wurde die Infektion in verschiedenen Medien durchgeführt, um unterschiedliche (Nährstoff-) Bedingungen zu testen. Zudem wurden verschiedene Invasionszeiten getestet, um eine möglichst hohe Invasionsrate zu erhalten. Zusätzlich zu den *A. castellanii* ATCC wurden weitere Amöbenstämme in der Infektion untersucht, da mehrere Studien eine Serovarspezifität der Amöben beschreiben [17, 171]. Auch wurde getestet, ob man auf eine Gentamicinbehandlung und Waschschrte verzichten kann, um physiologische Auswirkungen, wie z. B. Zystenbildung auf die Amöben zu minimieren.

Es stellte sich heraus, dass die Infektion in Leitungswasser (Berlin) und Infektionsmedium die besten Ergebnisse zeigte, da sich die Bakterien in diesen Medien zum einen schwächer extrazellulär replizierten als in den Weiteren (Daten nicht gezeigt) und die Bakterien zum anderen in direkter Assoziation zu den Amöben lokalisiert waren. Adhärenente Bakterien waren bereits nach 1h Infektion klar um die Amöben sichtbar (Abb. 4.11 a, b), aber auch nach 20h Infektion frei und Amöben-assoziiert zu beobachten (Abb. 4.11 c). Die Ergebnisse zeigten zudem, dass eine Gentamicinbehandlung und ein anschließender Mediumswechsel notwendig waren, da sich Salmonellen sowohl in Leitungswasser (Berlin) wie auch in Infektionsmedium vermehrten, was eine Infektionsauswertung (speziell nach mehreren Stunden Infektion) verhinderte. Da bei der Infektion mit weiteren Amöbenstämmen keine Veränderungen zu den oben genannten Interaktionen mit Bakterien auftraten, wurde sich im Weiteren auf den *A. castellanii* Stamm ATCC beschränkt, da mit diesem Amöbenstamm auch der agarbasierte Screen durchgeführt wurde (s. 3.11). Letztlich wurden die *A. castellanii* ATCC wie unter 3.4.1 beschrieben, mit einer MOI 10, bei 37°C, in Infektionsmedium und/ oder Leitungswasser, infiziert.

Ein generelles Problem im Amöbenmodell war der Nachweis einer effektiven Infektion. Die erzielten Ergebnisse der Amöbeninfektion mit plasmidtragenden Salmonellen ließen keine Diskriminierung von Invasion oder Adhäsion der Bakterien in bzw. an die Amöben zu (Abb. 4.11).

ERGEBNISSE

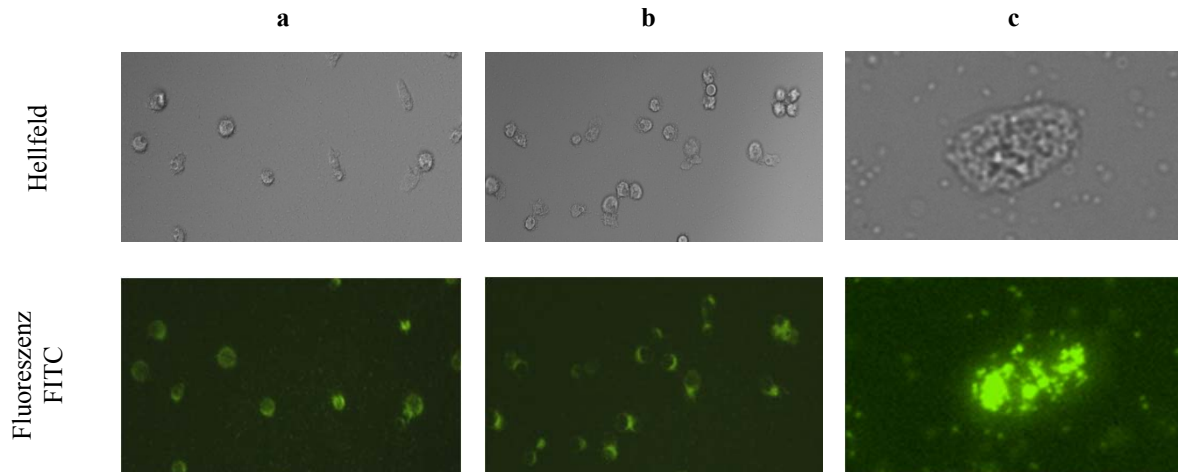


Abbildung 4.11: *A. castellanii* Infektion mit *Salmonella* (pFPV25.1). Die Zellen wurden mit einer MOI 10 in Infektionsmedium infiziert. Die mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzsignale von GFP (FITC) erfolgte 1h (a, b; STM LT2 WT (pFPV25.1)) bzw. 20h (c; STM 14928 WT (pFPV25.1)) nach Infektion. a und b zeigen adhärenente Bakterien um die Amöben. Die Ergebnisse verdeutlichen die Schwierigkeiten einer Diskriminierung von Invasion oder Adhäsion. Vergrößerung 200x (Bilder in c zeigen gezoomte Bildausschnitte der Aufnahme). Die Daten repräsentieren > drei unabhängige Experimente.

Daher entstand die Idee, die Zellen zu fixieren, um eine anschließende differentielle Immunfärbung zu ermöglichen. Hierbei können extrazelluläre und intrazelluläre Bakterien diskriminiert werden und somit eine effektive Infektion von Zellen nachgewiesen werden. Diese Methode wurde zunächst für Makrophagen wie folgt etabliert.

Nach der Infektion wurden die U937-Zellen wie unter 3.10.2 beschrieben immungefärbt. Bei dieser „Doppel-Färbung“ wurden extrazelluläre Bakterien mit dem sekundären Antikörper A488 gekoppelt. Nach anschließender Permeabilisierung der Wirtszellen mittels Detergenz wurden intrazelluläre Erreger entsprechend mit dem Antikörper A594 inkubiert. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gefärbt. Anschließend konnten die Fluoreszenzsignale mikroskopisch ausgewertet werden (Abb. 4.12).

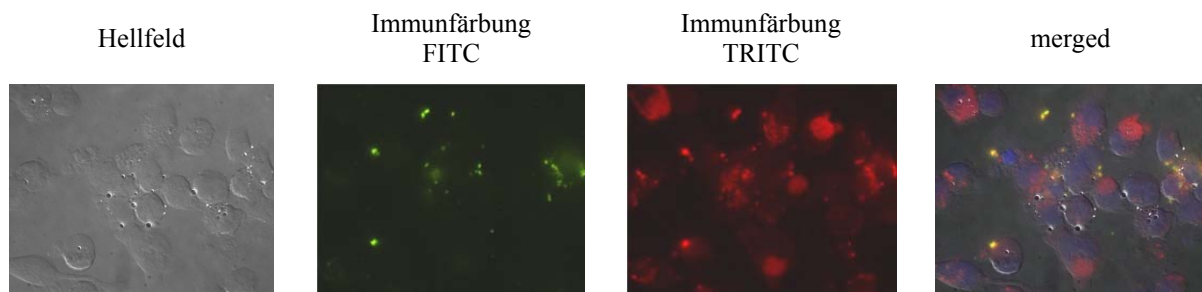


Abbildung 4.12: Differentielle Immunfärbung einer Makrophageninfektion mit *Salmonella*. Die U937-Zellen wurden mit einer MOI 10 mit dem STM LT2 Wildtyp infiziert (24h) und nach der Immunfärbung fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Die extrazellulären Bakterien wurden durch ein grünes Signal sichtbar, die intrazellulären hingegen durch ein rotes Signal. Der Zellkern der Makrophagen wurde mittels DAPI gefärbt (blau). Durch *mergen* der Bilder konnte man deutlich zwischen extra- und intrazellulären Bakterien diskriminieren und eine Infektion der Makrophagen nachweisen. Vergrößerung 600x. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente.

ERGEBNISSE

Vereinzelte extrazelluläre Bakterien (grün) waren deutlich von den intrazellulären (rot) zu unterscheiden. Mit der differentiellen Immunfärbung konnte somit eine Infektion verifiziert werden, d.h. intrazelluläre Salmonellen konnten detektiert und deren Vermehrung in der Wirtszelle über Vergleiche unterschiedlicher Infektionszeiten verdeutlicht werden (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss wurde die differentielle Immunfärbung für die Amöbeninfektion angewandt. Wie sich herausstellte lag die Schwierigkeit bei dieser Methode in der Fixierung der Amöben. Die Behandlung mit PFA (Paraformaldehyd) führte zu physiologischen Veränderungen der Amöben, die sich abrundeten und infolge dessen nicht mehr am Deckgläschen adhärirten. Die anschließenden Waschschrte führten dann zum Verlust der Amöben. Auch die Behandlung mit Methanol zur Fixierung der Einzeller führte gleichermaßen zu physiologischen Veränderungen der Protozoen. Auf Grund dieser Problematik ist es nicht gelungen die Amöben zu fixieren und eine differentielle Immunfärbung zum Nachweis intrazellulärer Salmonellen in Amöben durchzuführen. Möglicherweise könnten elektronenmikroskopische Untersuchung Aufschluss über eine effektive Infektion der Amöben geben. Bei dieser Methode wird eine Glutaraldehydlösung zur Fixierung der Zellen verwendet. Die Wirkung bzw. Effektivität dieses Fixanz auf die Amöben konnte in der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte letztlich keine Infektion von Amöben mit Salmonellen nachgewiesen und demzufolge kein qualifiziertes Salmonellen-Amöbeninfektionsmodell etabliert werden.

Eine Hypothese war, dass sich Salmonellen, nach der Amöben-Internalisierung unter den gewählten Bedingungen nicht intrazellulär etablieren konnten. Bei Legionellen ist das für *rpoS*-Mutanten von *L. pneumophila* JR32 beschrieben, die in Amöben nicht zur Vermehrung befähigt sind [172]. Folglich wurde das *rpoS* Gen in den verwendeten *Salmonella* Stämmen überprüft (s. 4.3.1).

Eine weitere Hypothese war, dass STM im Gegensatz zu *L. pneumophila* eher dem Fraß durch *A. castellanii* widersteht. Die Durchführung eines Plaqueassays sollte diese Vermutung untersuchen und näheren Aufschluss über eine bestehende Amöben-Salmonellen-Interaktion geben (s. 4.3.2).

4.3.1 Analyse von *rpoS* in verschiedenen *Salmonella* Stämmen

Das *rpoS* Gen kodiert den RNA Polymerase Sigma Faktor RpoS und Mutationen in diesem Gen resultieren in einem attenuierten *Salmonella* Virulenzverhalten im Mausinfektionsmodell [173]. Zudem reguliert der Sigma Faktor vermutlich die Expression von Genen, die für das intrazelluläre Wachstum in Protozoen benötigt werden. *rpoS*-Mutanten von *L. pneumophila* können sich zwar in Makrophagen replizieren, nicht aber in *A. castellanii* [172]. Vermutlich ist ein intaktes *rpoS* Gen auch bei Salmonellen für eine effektive Amöbeninfektion erforderlich. Deshalb wurden die verwendeten STM Stämme über Sequenzanalysen auf ein intaktes unmutiertes *rpoS* Gen geprüft.

4.3.1.1 Analyse der *rpoS* Sequenzen in verschiedenen *Salmonella* WT-Stämmen

Die *rpoS* Sequenzen für die *Salmonella* Stämme LT2, SL1344 und 14028 sind in der Genomdatenbank NCBI hinterlegt und die zunächst durchgeführte *in silico* Analyse ergab eine 100%ige Homologie der Gensequenzen (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchungen der tatsächlichen *rpoS* Sequenzen der verwendeten STM Stämme wurden Oligonukleotidpaare konstruiert und für eine PCR und anschließende Sequenzanalysen genutzt.

Mit dem Erhalt des STM LT2 Stammes wurde die Information übermittelt, dass es sich um den „Urstamm“ handle, mit einem intakten unmutierten Startkodon im *rpoS* Gen. Die Auswertung der erhaltenen *rpoS* Sequenz dieses Wildtyps ergab jedoch eine unerwartete *in frame* Mutation des Startkodons von ATG zu TTG. TTG ist ein alternatives Startkodon und kodiert für ein Methionin, jedoch ist die Translation vermindert woraus ein geringes Level an produziertem Protein resultiert. *Salmonella* Stämme mit dieser Mutation sind sensitiv gegenüber Umweltstress und attenuiert in der Mausinfektion [174]. Auch das *rpoS* von STM SL1344 wies eine Mutation auf. Hier waren an Position 171 im Gen zwei Nukleotide (GT) deletiert, was einen *frameshift* zur Folge hat. Ein funktionelles RpoS kann somit nicht exprimiert werden. Im dritten untersuchten STM Stamm zeigten die Ergebnisse ebenfalls mutierte Sequenzunterschiede. Durch die Punktmutation von T zu A an Position 399 im 14028 *rpoS* Gen resultiert ein Aminosäuretausch von einem Leucin zu Glutamin (Daten nicht gezeigt). Durch diese Substitution waren aber keine Auswirkungen auf die Genexpression zu erwarten, da es sich hierbei um eine „*missense*“ Mutation handelt.

ERGEBNISSE

Alle in dieser Arbeit verwendeten STM WT Stämme waren demnach im *rpoS* Gen mutiert. Um zu klären, ob die Mutationen bereits beim Erhalt der Stämme vorhanden waren oder bedingt durch die Labornutzung auftraten, wurden die *rpoS* Gene der jeweils ersten Scatterklone (sc 1 bis 3) der STM Stämme LT2 und SL1344 sequenziert. Die Auswertung dieser *rpoS* Sequenzen zeigte, dass die oben beschriebenen Mutationen in allen getesteten Klonen auftraten (Daten nicht gezeigt). Es war somit davon auszugehen, dass die Mutationen bereits bei Erhalt der Stämme vorhanden waren.

4.3.1.2 Infektionsverhalten von STM *rpoS*-Mutanten in etablierten Infektionsmodellen

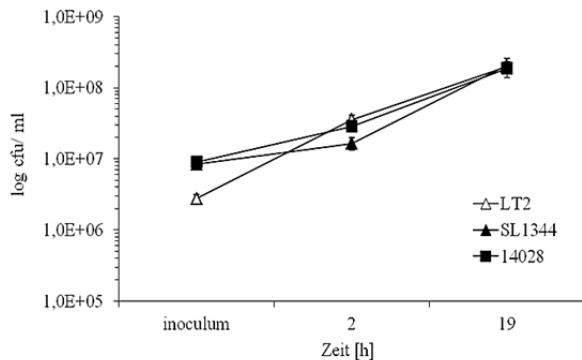
Salmonellen, die *rpoS*-Mutationen tragen, weisen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Säurestress und DNA-Schäden auf, sie sind in ihrem Infektionsverhalten in Zellkultur-experimenten jedoch nicht attenuiert [173]. Um zu verifizieren, dass die *rpoS*-Mutationen der in dieser Arbeit verwendeten STM WT Stämme ebenso keine Auswirkungen auf das Infektionsverhalten zeigen, wurde die Invasions- und Replikationsfähigkeit dieser Stämme erneut in etablierten humanen Infektionsmodellen getestet. Diese Untersuchung diene zudem dem Nachweis, dass die Mutationen bereits beim Erhalt der Stämme vorhanden waren und nicht während dieser Arbeit durch die Labornutzung entstanden sind.

Da bei dem 14028 WT Stamm durch die Punktmutation („*missense*“ Mutation) lediglich eine Aminosäuresubstitution und keine Auswirkung auf die Genexpression zu erwarten war, wurde der Stamm als Referenz betrachtet.

Bei den STM LT2 und SL1344 WT konnten sowohl in humanen Makrophagen (Abb. 4.13, A) wie auch in Epithelzellen (Abb. 4.13, B) keine Auswirkungen im Infektionsverhalten durch die mutierten *rpoS* Gene festgestellt werden. Die Wildtypen verhielten sich analog zum 14028 Stamm und zeigten keine Attenuation der Invasion oder intrazellulären Replikation. Zudem waren die Ergebnisse äquivalent zu denen aus früheren Infektionsversuchen, was darauf hindeutete, dass die Mutation wie bereits vermutet schon zu Beginn dieser Arbeit vorhanden waren.

ERGEBNISSE

A



B

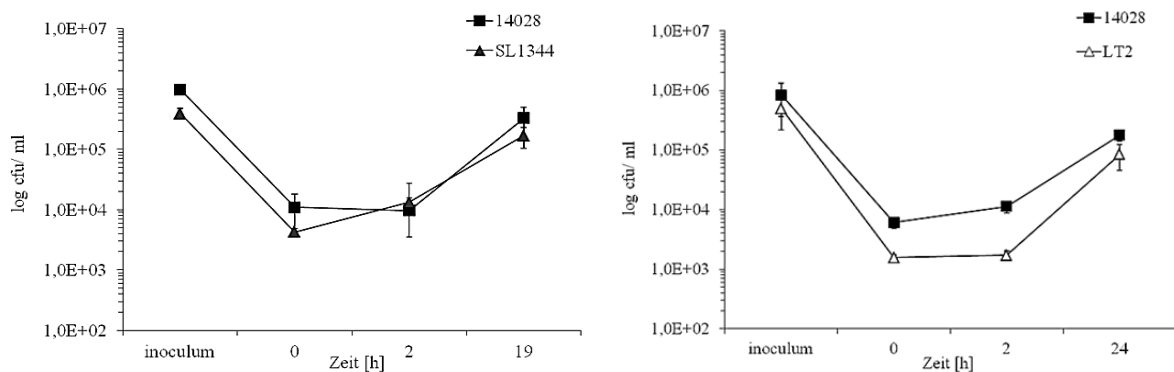


Abbildung 4.13: STM *rpoS*-Mutanten in etablierten humanen Infektionsmodellen. A) U937-Makrophageninfektion (MOI 10). B) HeLa-Epithelzellinfektion (MOI 10). Die Infektionen zeigten keine signifikanten Unterschieden im Infektionsverhalten der getesteten STM WT mit Mutation im *rpoS* Gen. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Mutationen in den *rpoS* Genen der STM WT Stämme beeinflussten unsere Interpretationen in den etablierten humanen Infektionsmodellen daher nicht. Im Amöbenmodell könnte die *rpoS* Mutation jedoch, wie für Legionellen gezeigt, eine entscheidende Rolle in der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit spielen, was sich hier nicht widerlegen ließ.

4.3.2 Amöben-Salmonellen-Interaktion im Agarplattenassay

Die Durchführung eines Plaqueassays sollte die Hypothese untersuchen, ob STM im Gegensatz zu *L. pneumophila* eher dem Fraß durch *A. castellanii* widerstehen, weshalb keine effektive Amöbeninfektion etabliert werden konnte. Hierzu wurden wie unter 3.12.1 beschrieben Bakterien auf *non nutrient*-Agarplatten (NNA) aufgebracht und anschließend mit zentral platzierten *A. castellanii* inkubiert. Als Kontrollstamm diente ein *E. coli*, der nicht

ERGEBNISSE

resistent gegenüber Amöben ist [175] und ebenfalls einen Scatterphänotyp, wie für *Salmonella* beschrieben bildet (Dr. Auraß, *unpublished*). Die Auswertung der täglich dokumentierten Plaquebildung ist in Abbildung 4.14 zu sehen. Die Amöben waren in der Lage sowohl im *E. coli* Kontrollstamm wie auch in den STM Bakterienrasen vergleichbar große Plaques zu bilden. Nach 5 Tagen Inkubation bei RT war der komplette Bakterienrasen dezimiert. Demnach waren die Amöben in der Lage die Salmonellen als Nahrungsgrundlage zu nutzen, was die Vermutung widerlegte, dass die STM widerstandsfähiger gegenüber dem Amöbenfraß sind.

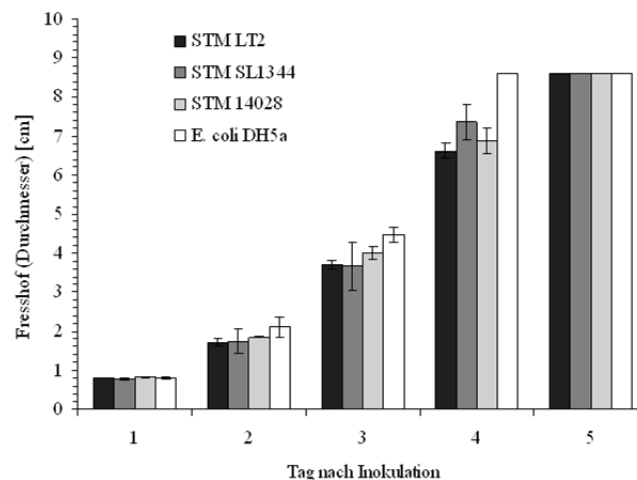


Abbildung 4.14: Plaqueassay auf NNA-Agarplatten. Die Stämme STM LT2, SL1344, 14028 und *E. coli* DH5α (Kontrollstamm) wurden auf NNA-Agarplatte plattiert. Danach wurde je 10µl *A. castellanii* Amöbensuspension mittig auf die Agarplatte getropft und die Plaquebildung bei RT Inkubation dokumentiert. Die Daten repräsentieren Doppelwerte eines durchgeführten Versuches.

Der beobachtete Amöbenfraß war nicht durch die *rpoS*-Mutation in den *Salmonella* Stämmen zu begründen (s. 4.3.1), da der STM 14028, dessen RpoS Expression durch eine „missense“ Punktmutation nicht beeinträchtigt sein sollte, ebenfalls und in gleichem Maße dezimiert wurde.

Die Ergebnisse der Plaqueassays warfen nun die Frage auf, ob bzw. wie der Amöbenfraß in Zusammenhang mit der beschriebenen natürlichen Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben [17, 19] steht und wie der *Salmonella* Scatterphänotyp zu betrachten ist.

Wie zuvor erwähnt trat dieser Scatterphänotyp ebenfalls bei den untersuchten STM WT Stämmen auf, wenn auch verzögert zu etablierten Virulenz-assoziierten Mutanten (s. 4.1.2) und den Scatterklonen (s. 4.1.3). Im Weiteren war von Interesse wie sich selten mit Humaninfektionen-assoziierte Serotypen in dem Screenassay verhalten und ob der „strahlenförmige“ Scatterphänotyp womöglich ein generell auftretendes Phänomen bei der

ERGEBNISSE

Interaktion von Amöben mit Salmonellen ist. Dazu wurde zusätzlich zu den *A. castellanii* ATCC Amöben, ein weiterer *A. castellanii* Stamm bezeichnet als NEFF für den Assay verwendet und die Untersuchungen mit zusätzlichen *Salmonella* Stämme im agarbasierten Screen auf Suszeptibilität gegenüber Amöben durchgeführt.

Wie unter 3.12.2 wurden die Bakterienstämme für den Amöbenresistenztest eingesetzt und die Phänotypbildung dokumentiert. Interessanterweise trat der Scatterphänotyp, mit Ausnahme der Subspezies IIIb, bei allen getesteten Stämmen in der Interaktion mit *A. castellanii* ATCC auf. Die Phänotypbildung bei der Interaktion mit dem NEFF Amöbenstamm blieb jedoch aus (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Amöbenresistenztest verschiedener Bakterienstämme mit *Acanthamoeba castellanii*.

	<i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC		<i>Acanthamoeba castellanii</i> NEFF	
	Scatterphänotyp	Tag erstes scattern	Scatterphänotyp	Tag erstes scattern
Infektionsmedium (Kontrolle)	-	-	-	-
<i>E. coli</i> DH5α (Positivkontrolle)	+	6	-	-
STM 14028	+	5	-	-
STM MvP818 (<i>invC::FRT</i>)	+	5	-	-
STM P2D6 (<i>ssaV::Tn5</i>)	+	5	-	-
<i>S. serovar</i> Enteritidis	+	5	-	-
<i>S. serovar</i> Infantis	+	6	-	-
<i>S. serovar</i> Derby	+	5	-	-
<i>S. serovar</i> Senftenberg	+	5	-	-
<i>S. serovar</i> Dublin	+	6	-	-
STM LT2	+	6	-	-
STM SL1344	+	6	-	-
STM (11-01087)	+	6	-	-
STM (11-01086)	+	5	-	-
<i>S. serovar</i> Brandenburg	+	6	-	-
Subspezies IIIb	-	-	-	-
Subspezies II	+	6	-	-

Eine mikroskopische Untersuchung der Kolonien auf den Platten mit Bakterien und den *A. castellanii* ATCC Amöben Stamm zeigte, dass die Amöben in den Bakterienkolonien konzentriert waren und sich dort auch vermehrten. Dieselbe Beobachtung wurde mit dem *A. castellanii* NEFF Amöben gemacht, wobei sich hier der Scatterphänotyp nicht ausbildete (Daten nicht gezeigt). Im Plaqueassay für Amöbenfraß konnte für *A. castellanii* NEFF Amöben jedoch nachgewiesen werden, dass sie ebenso wie *A. castellanii* ATCC in der Lage waren Salmonellen als Nahrungsgrundlage zu nutzen (Daten nicht gezeigt).

Daher ist das Ausbleiben des Phänotyps nicht durch eine Resistenz gegenüber Amöbenfraß zu begründen. Der *A. castellanii* NEFF Stamm ist der adhärentere Stamm, womöglich sind die Amöben auf Agarplatten weniger mobil, was ein Fehlen des Scatterphänotyps, der u. a. auf Grund der Amöbenbewegung in bzw. aus Bakterienkolonien zustande kommt, erklären könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der *Salmonella* Scatterphänotyp kein generell auftretendes Phänomen in der Interaktion von Amöben mit Salmonellen auf Agarplatten ist, aber in der Interaktion mit dem Stamm *A. castellanii* ATCC auf LB-Platten auftritt. Des Weiteren ist das Ausbleiben des Phänotyps kein Anzeichen der Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben. Somit konnten umfangreiche Versuche zeigen, dass der *Salmonella*-Scatterphänotyp kein Merkmal für eine Virulenzattenuierung ist.

4.4 Charakterisierung Patatin-ähnlicher Proteine von *Salmonella* Typhimurium

Die Analyse von potentiellen neuen Virulenzfaktoren war auch im Weiteren der Arbeit thematisiert. Studien zur Identifizierung und Charakterisierung von *Legionella* Genen mit Bedeutung für die Amöbeninfektion belegen, dass in diesem Zusammenhang u. a. Phospholipasen, wie PatD, eine entscheidende Rolle als Virulenzfaktor spielen [152]. PatD gehört zu einer Gruppe bakterieller Phospholipasen, die als Patatin-ähnliche Proteine (PLP = *patatin like proteins*) bezeichnet werden. Auch Salmonellen besitzen mindestens ein PLP [113]. Bisher gibt es jedoch keine publizierten Daten über die Funktion von PLP dieser enteropathogenen Bakterien. Auf Grund von Sequenzhomologien zu anderen bakteriellen Phospholipasen konnte aber eine hypothetische Rolle dieser Proteine in der Virulenz vermutet werden. Um dem nachzugehen stand die Untersuchung Patatin-ähnlicher Proteine von *Salmonella* Typhimurium, bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität und möglichen Rolle bzw. Wirkmechanismus für die Infektion von Wirtszellen im Vordergrund des zweiten Teils der Arbeit.

4.4.1 Sequenzvergleiche von *Salmonella* Patatin-ähnlichen Proteinen

Banerji und Flieger konnten bereits 2004 durch Sequenzvergleiche zeigen, dass das YchK von STM LT2 ein Patatin-ähnliches Protein ist und in der Aminosäuresequenz die vier charakteristischen Domänen trägt [113]. Daher wurde zunächst eine umfangreiche Homologiesuche zu diesem und anderen bakteriellen sowie eukaryotischen PLP durchgeführt, um weitere mögliche PLP in *Salmonella* zu identifizieren.

ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit konnte so durch Sequenzvergleiche zu Patatin B2 und beschriebenen PLP, VipD/ PatA und ExoU, zum ersten Mal gezeigt werden, dass neben YchK auch YjjU von STM zu den PLP zu gruppieren ist. In beiden Proteinen liegen die charakteristischen Aminosäuren in vier konservierten Blöcken vor (Abb. 4.15). Block I beinhaltet fünf relevante Aminosäuren (As) in einer glyzinreichen Region mit einem konservierten Lysin oder Arginin. In Block II ist das Konsensusmotiv G-X-S-X-G enthalten, wobei das zentrale Serin zusammen mit dem Aspartat, der drei typischen As in Block IV, die katalytische Diade bilden könnte. In Block III ist das A-S-X-X-X-P Motiv enthalten, welches in homologen eukaryotischen PLP als konserviertes A-A-P Motiv auftritt.

Des Weiteren zeigte die Vergleichsanalyse, dass die PLP in vielen Prokaryoten und Eukaryoten, sowie Wirbeltieren vorkommen (Daten z. T. nicht gezeigt). Interessanterweise ließen sich, in den zur Analyse verwendeten Bakterienstämmen, homologe Proteine sowohl für YchK wie auch für YjjU finden. Beide PLP waren in evolutionär verwandten Stämmen, wie *Shigella* und *Escherichia* zu finden, genauso wie in dem Human-adaptierten *S. Typhi* Stamm.

Protein	Organismus	Δ	Block I	Δ	Block II	Δ	Block III	Δ	Block IV	Δ	gi
YchK	<i>S. Typhimurium</i> str. LT2	10	GSGAARGWSHIGVIKA	7	IDIVA GCSIGSLVGAAYACNKLK-A	71	LHLAVRASCSMEGLMSP	6	MLVDGAVVNPV-P	138	16765098
hypoth. P.	<i>S. Typhi</i> str. CT18	10	GSGAARGWSHIGVIKA	7	IDIVA GCSIGSLVGAAYACNKLK-A	71	LHLAVRASCSMEGLMSP	6	MLVDGAVVNPV-P	138	16760129
YchK	<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	23	GSGAARGWSHIGVINA	7	IDIVA GCSIGSLVGAAYACDRLS-A	71	LHLAIRASCSIPGLMAP	6	MLVDGAVVNPV-I-P	138	12514952
YchK	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	10	GSGAARGWSHIGVINA	7	IDIVA GCSIGSLVGAAYACDRLS-A	71	LHLAIRASCSIPGLMAP	6	MLVDGAVVNPV-I-P	138	56479861
YjjU	<i>S. Typhimurium</i> str. LT2	29	EGGGQRGIFTAGVLDE	8	PHLYFGTSAGAQNLSAYLCNQPGYG	77	WLDIIRASSAIPGFYRT	7	NYLDGGSIDAI-P	166	16767804
hypoth. P.	<i>S. Typhi</i> str. CT18	29	EGGGQRGIFTAGVLDE	8	PHLYFGTSAGAQNLSAYLCNQPGYG	77	WLDIIRASSAIPGFYRT	7	NYLDGGSIDAI-P	166	16763358
yjjU Genprodukt	<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	29	EGGGQRGIFTAGVLDE	8	FDLYLGTSAQAQNL SAYICNQPGYA	77	WLDVIRASSAIPGFYRS	7	NYLDGGSIDAI-P	166	15804949
yjjU Genprodukt	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	29	EGGGQRGIFTAGVLDE	8	FDLYLGTSAQAQNL SAYICNQPGYA	77	WLDVIRASSAIPGFYRS	7	NYLDGGSIDAI-P	166	56480607
VipD/ PatA	<i>L. pneumophila</i> str. Philadelphia	40	SGGGAKGISLGMIAQ	9	LTHVS GASAGAMTASILAVGMDIKD	170	IAQVQWSGAHEVLFVP	7	YIADGSLDNN-P	325	52630138
ExoU	<i>P. aeruginosa</i> PA 103	109	SGGGAKGAAYPGAMLA	9	IRSMS GSSAGGITAAALASGMSPA	149	VAQAHHISGFPVGFQK	15	EPQDGGVMINV-P	335	2429143
NTE	<i>Homo sapiens</i>	940	GGGGARGCSHIGVLKA	7	VDLVGTSIGSFIGALYAEERSASR	74	LMRYVRASMTLSGLFPP	8	LLMDGGYINNL-P	233	23398599
Patatin B2	<i>Solanum tuberosum</i>	34	DGGGIKGIIPAILLEP	19	FDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNR	85	MYDICYSTAAAEIYFPF	15	NLVDGAVATVGR	162	21510
			* *		* * *			* *			

Abbildung 4.15: Aminosäuresequenzvergleich der Patatin-ähnlichen Proteine YjjU und YchK aus *Salmonella* und homologen Proteinen. Grau unterlegt sind die für die Blöcke I-IV charakteristischen Aminosäuren. Δ geben die Aminosäurezahl vor, zwischen und nach den Domänen an. Die Sequenzen wurden in der Genomdatenbank NCBI recherchiert. Align mit ClustalW.

Durch weitere Sequenzvergleiche innerhalb des Genus konnte gezeigt werden, dass auch in der zweiten *Salmonella* Spezies, *S. bongori* (NCTC 12419), zwei hypothetische Proteine (gi 339999588, gi 340001868) mit je 98% Homologie und 96% Identität zu den Proteinen YchK und YjjU der Spezies *S. enterica* zu finden sind.

Innerhalb der Spezies *S. enterica* ist das Protein YchK neben der Subspezies I (*enterica*) nur noch in der Subspezies IIIa (*arizonae*) mit 97% Identität und 99% Homologie eines hypothetischen Proteins vertreten. Auch das YjjU Protein weist nur zu einem hypothetischen Protein der Subspezies IIIa 98% Identität und 99% Homologie auf. In den weiteren *S. enterica* Subspezies II (*salamae*), IIIb (*diarizonae*), V (*houtenae*) und VI (*indica*) findet man keine der beiden PLP homologen Proteine. Die Volllängeproteine von 301aa (YchK) und

ERGEBNISSE

357aa (YjjU) weisen innerhalb der bisher genomsequenzierten Serovare von *S. enterica* subsp. *enterica* eine Identität und Homologie von 100% auf. Um die PLP von *Salmonella* näher zu untersuchen, sollten die Proteine zunächst über *in silico* Analysen charakterisiert werden.

4.4.2 *In silico* Analyse von *Salmonella yjjU* und *ychK*

Die *in silico* Analysen der Gene *yjjU* und *ychK* wurden an der Grundlage der Genomsequenz von STM LT2 (NCBI: NC_003197.1) und STM 14028 (NCBI: CP001363.1) recherchiert [156], da für Klonierungsversuche der STM LT2 Hintergrund verwendet und weitere funktionelle Analysen mit dem STM 14028 Stamm durchgeführt wurden. Die untersuchten Gene *yjjU* und *ychK* liegen in beiden STM Stämmen mit 100%iger Homologie vor. Aufgrund der *rpoS* Mutation des LT2 Stammes (s. 4.3.1.1) wurde dieser nicht für weitere Versuche verwendet. Tabelle 4.7 zeigt eine Zusammenfassung der erstellten *in silico* Daten.

Tabelle 4.7: Überblick der *in silico* Analyse der *Salmonella* Gene *yjjU* und *ychK*. Die Sequenzen der *Salmonella* Gene wurden in der Genomdatenbank NCBI an der Grundlage der Genomsequenz von STM LT2 (NC_003197.1) und STM 14028 (CP001363.1) recherchiert. „-“ kennzeichnet ein Fehlen und „+“ einen Nachweis der jeweiligen Charakteristik.

STM	<i>yjjU</i>		<i>ychK</i>	
	LT2	14028	LT2	14028
Lokalisation	Chromosom	Chromosom	Chromosom	Chromosom
locus tag	STM4563	STM14_5482	STM1754	STM14_2120
Position	4816910-4817983	4829743-4830816	1850043-1850948	1860732-1861637
Orientierung	+ Strang	+ Strang	- Strang	- Strang
Gengröße	1074 bp	1074 bp	906 bp	906 bp
GC-Gehalt (normal 52-54%)	57,53 %	57,53 %	50,88 %	50,88 %
Proteinannotation	Phosphoesterase	putative Phosphoesterase	hypothetisches Protein	hypothetisches Protein
gi	16767804	267996925	16765098	267993701
Proteingröße	357 aa	357 aa	301 aa	301 aa
Molekulargewicht	39,66 kDa	39,66 kDa	33,1 kDa	33,1 kDa
Isoelektrischer Punkt	9,02	9,02	7,14	7,14
Signalpeptid (SignalP)	-	-	-	-
Transmembrandomänen (FASTA)	-	-	-	-
Operon (Softberry)	+	+	+	+
T3SS (ChlamydiaeDB)	-	-	-	-

Das STM LT2 Gen *yjjU* liegt in gleicher Orientierung zu seinen flankierenden Genen *STM4562* und *yjjV* (Abb. 4.16). Nach Vorhersagen ist *yjjU* mit *yjjV* in einem Operon organisiert (Softberry). *yjjV* kodiert eine 257 Aminosäuren große Deoxyribonuklease. Das

ERGEBNISSE

Protein beinhaltet eine TatD-DNase Region. TatD ähnliche Proteine sind, wie *E. coli* TatD, zytoplasmatische Proteine und zeigen eine Magnesium abhängige DNase Aktivität [176].

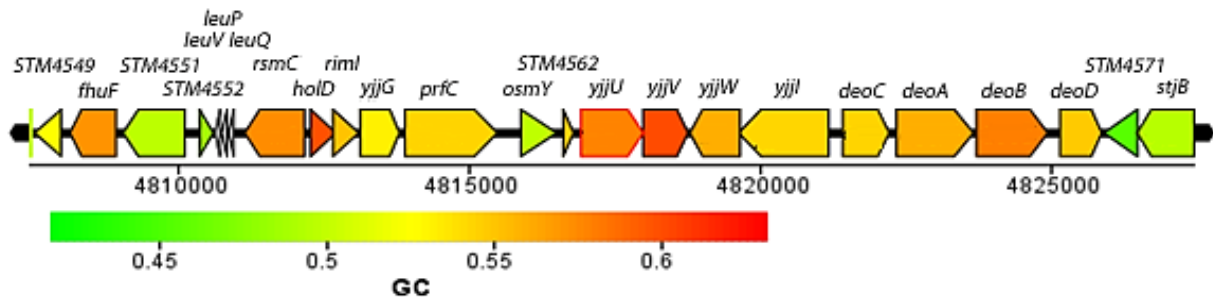


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der Gene in der Region um STM *yjjU*. (Position 4807447-4827446). Die Gene sind entsprechend ihres GC-Gehalts gefärbt und an *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 recherchiert. Modifiziert nach www.xbase.ac.uk.

Für das Protein YjjU wird mit dem Programm SignalP kein putatives Signalpeptid zur Sekretion via Sec-Sekretionssystem vorhergesagt [177]. Berechnungen zur Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle [178] weisen auf ein Fehlen von Transmembrandomänen hin. Mit Hilfe des Programms ChlamydiaeDB konnte keine Sekretion über ein bekanntes Typ-III-Sekretionssystem von gramnegativen Bakterien vorhergesagt werden [179]. Das STM YjjU besitzt eine spezifische Region, welche als „*Pat_hypo_Ecoli_yju_like*“ bezeichnet wird und kennzeichnend für eine Region der Patatin- und cPLA₂-Superfamilie ist. Diese Familie besteht überwiegend aus bakteriellen Patatin-Glykoproteinen, sowie einigen Proteinen aus Eukaryoten und Archaea.

Auch das zweite STM LT2 Gen *yhcK* befindet sich auf dem komplementären Strang in gleicher Orientierung wie das *downstream* gelegene Nachbarn *hnr* (4.17). Dieses Gen ist ein beschriebener RpoS Regulator und ist mit *yhcK* in einem Operon organisiert vorhergesagt (OperonDB, Softberry). Das *hnr* Homologe in *E. coli* ist in *rssB* umbenannt worden [180]. RssB (auch SprE, MviA, YchL) ist ebenso ein RpoS Regulator, welcher den Abbau des generellen Stress-Sigmafaktors σ^S durch die Protease ClpX erleichtert und reguliert [181-184]. Interessanterweise ist das *Salmonella* Hnr dem MviA aus *Salmonella enterica* 100% identisch, ein 38 kDa Protein [185]. Das *mviA* Gen spielt eine Virulenz-regulatorische Rolle für STM in Mausinfektionen. Der virulente Stamm STM SL1344 sowie 14028 beispielsweise tragen dieses Gen und Studien zu Folge sind *mviA* *knockout*-Mutanten avirulent und produzieren einen als *small colony morphology* bezeichneten Phänotyp [185-187]. Das *upstream* folgende Gen *yhcJ* ist entgegengesetzt zu *yhcK* orientiert und kodiert ein hypothetisches Protein, das noch nicht charakterisiert ist.

ERGEBNISSE

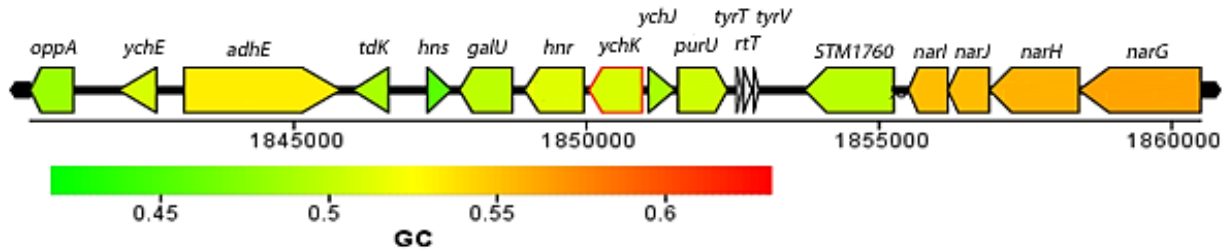


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Gene in der Region um STM *ychK*. (Position 1840496-1860495). Die Gene sind entsprechend ihres GC-Gehalts gefärbt und an *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 recherchiert. Modifiziert nach www.xbase.ac.uk.

Genau wie für YjjU wird auch für YchK mit Hilfe von SignalP kein Sec-Signalpeptid vorhergesagt [177]. Nach anderen Programmen, wie Phobius [188] oder YRC (Yeast Resource Center) [189], ist jedoch ein 19aa (Phobius) bzw. ein 17aa (YRC) großes Signalpeptid vorhanden. Durch die Spaltstellen würde jedoch der erste konservierte Aminosäureblock inklusive dem putativ katalytisch aktiven Serin zerstört, siehe 4.4.1, so dass für YchK kein Signalpeptid vermutet wurde. Transmembrandomänen (FASTA) [178] und die Sekretion über ein bekanntes Typ-III-Sekretionssystem von gramnegativen Bakterien konnten ebenfalls nicht vorhergesagt werden (ChlamydiaeDB) [179] (Tabelle 4.7).

Das Protein besitzt eine spezifische Region, welche zu den „bakteriellen Patatin-ähnlichen Phospholipase Domänen“ zählt und zur Patatin- und cPLA₂-Superfamilie gehört. Die bakteriellen Patatin-ähnlichen Phospholipase Domänen enthaltenden Proteine werden PNPLA abgekürzt. Zu dieser Gruppe gehören auch YchK und RssA aus *Escherichia coli*, sowie YlbK aus *Bacillus amyloliquefaciens* (NCBI).

Auf Grund der Homologie beider Proteine zu anderen bakteriellen PLP und da sowohl YjjU wie auch YchK eine Patatindomäne aufwiesen, sollten erste Versuche Aufschluss über deren Funktion und lipolytische Aktivität geben. Dazu wurden zunächst *Salmonella knockout*-Mutanten generiert und diese anschließend im Vergleich zum Wildtyp im Aktivitätsassay untersucht.

4.5 Herstellung *Salmonella knockout*-Mutanten

Zur Herstellung von STM *knockout*-Mutanten wurde nach der Methode von Datsenko und Wanner gearbeitet [146] und definierte Mutationen in den genetischen Hintergrund des

Stammes STM 14028 eingefügt. Anschließend konnten die Mutanten im Vergleich zum WT für weitere Untersuchungen, wie Aktivitätstests eingesetzt werden.

4.5.1 Herstellung des Integrationselements

Zur Generierung der *Salmonella knockout*-Mutanten wurde ein Allelaustausch der Zielgensequenz gegen eine Antibiotikaresistenzgenkassette durchgeführt. Das Integrationselement wurde in einer PCR-Reaktion mit dem Helferplasmid pKD4, welches eine Kanamycinresistenzgenkassette trägt, erzeugt (s. 3.6.1). Das 1470 bp große Integrationselement enthält zusätzlich FRT-sites (*FLP recognition target*), die für die nachträgliche Entfernung der Antibiotikaresistenzgenkassette notwendig sind. Das amplifizierte DNA-Fragment war somit 1550 bp groß und wurde nach erfolgter Elektrophorese in einem Agarosegel nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

4.5.2 Einbringen des Integrationselements in den Zielstamm und Verifizierung der kanamycinresistenten *knockout*-Mutanten

Das Einbringen des Integrationselements erfolgte durch Elektroporation in den Stamm STM 14028, der zusätzlich das Helferplasmid pKD46 enthält. Das Hilfssystem verhindert einerseits den Abbau linearer DNA in der Zelle durch Exonukleasen und vermittelt außerdem die homologe Rekombination von DNA-Fragmenten.

Die Überprüfung der Integration erfolgte auf Selektivagarplatten und anschließender Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden 1800/ 1801 (s. Tab. M 2.12) für ein deletiertes *yhcK* und 1802/ 1803 für Deletion von *yjjU* (Daten nicht gezeigt). Positive Klone wurden 14028 *yjjU::aph* (vP = vor Phagentransduktion) und 14028 *yhcK::aph* (vP) genannt.

Um mögliche Mehrfachinsertionen der Resistenzgenkassette und/ oder *second site* Mutationen auszuschließen, wurde die definierte Mutation anschließend mittels P22 Phagentransduktion in einen „frischen“ Stammhintergrund transferiert [190]. Die Donorstämme 14028 *yjjU::aph* (vP) Klon 1 und 14028 *yhcK::aph* (vP) Klon 1 wurden mit dem P22 Phagen bis zur Lyse inkubiert und so das transduzierende P22-Lysat hergestellt. Die Transduktion erfolgte durch Inkubation des Empfängerstammes STM 14028 mit dem entsprechenden Phagenlysate. Die Verifizierung der Integration der Kanamycinresistenz-

ERGEBNISSE

genkassette erfolgt mittels Kolonie-PCR mit den genflankierenden Oligonukleotiden 1800/ 1801 (*ychK*) bzw. 1802/ 1803 (*yjjU*) (s. Tab. M 2.12). Das PCR Produkt entsprach der erwarteten Größe von 1550 bp (Abb. 4.18, A) und bestätigte die erfolgreiche Intergration des 1470 bp großen Fragments mit Kanamycinresistenzgenkassette. Die erzeugten kanamycinresistenten *knockout*-Mutanten wurden 14028 *ychK::aph* Klon 1 bzw. 14028 *yjjU::aph* Klon 1 genannt.

Eine weitere PCR mit den geninternen Oligonukleotiden 1694/ 1688 (*ychK*) bzw. 1695/ 1689 (*yjjU*) ergab im Stamm STM 14028 für *ychK* das Amplifikat in erwarteter Größe von 906 bp und 1074 bp für *yjjU*. In der *knockout*-Mutante 14028 *yjjU::aph* Klon 1 wurde nur das intakte Gen *ychK* amplifiziert und entsprechend nur das Amplifikat für *yjjU* in der *knockout*-Mutante 14028 *ychK::aph* Klon 1 (Abb. 4.18, B), da durch die Deletion die Bindestellen der entsprechenden Oligonukleotide fehlten und demzufolge kein DNA-Fragment amplifiziert werden konnte. Die Ergebnisse bestätigten ebenfalls die Insertion der Resistenzgenkassette und zeigten zudem eine vollständige Deletion der Gene.

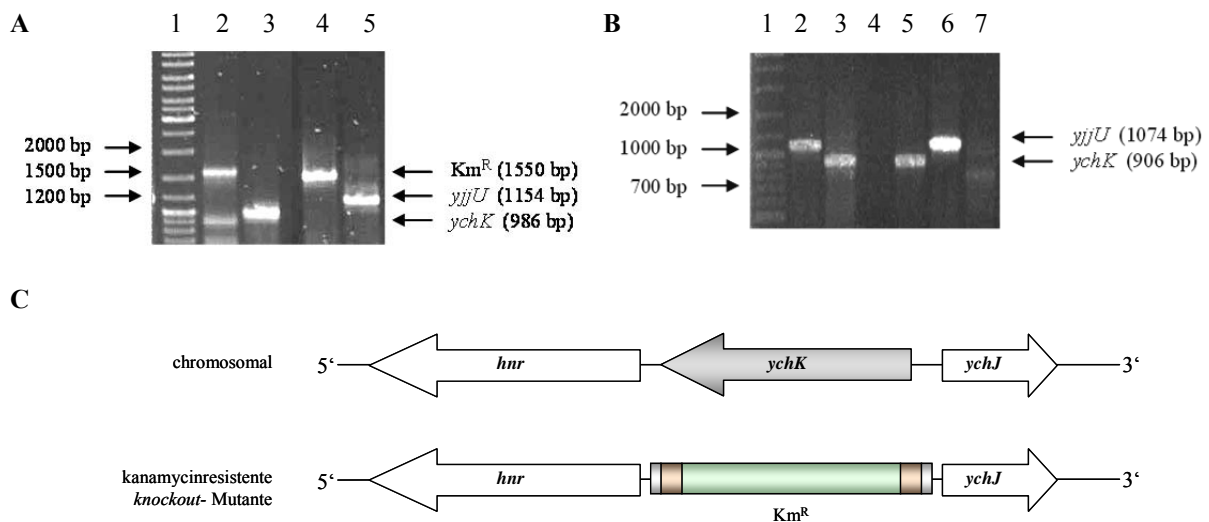


Abbildung 4.18: Verifizierung kanamycinresistenter STM 14028 PLP *knockout*-Mutanten. (1) GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). 1%iges (w/v) Agarosegel der Kolonie-PCR, **A:** mit genflankierenden Oligonukleotiden, (2) Nachweis des Amplifikats mit Insert in *ychK::aph* Klon 1, (3) *ychK* Amplifikat im WT, (4) Nachweis des Amplifikats mit Insert in *yjjU::aph* Klon 1, (5) *yjjU* Amplifikat im WT. **B:** mit genomischer DNA und geninternen Oligonukleotiden, (2) *yjjU* Amplifikat im WT, (3) *ychK* Amplifikat im WT, (5) Nachweis *ychK* in *yjjU::aph* Klon 1 und *yjjU* (4) lieferte hier kein Amplifikat. (6) Nachweis *yjjU* in *ychK::aph* Klon 1 und *ychK* (7) lieferte hier kein Amplifikat. **C:** Schematische Darstellung der chromosomalen Situation am Beispiel des *ychK* Mutantenstammes vor und nach Intergration der Resistenzgenkassette. grün = Km^R ; orange = FRT-sites; grau = homologe Bereiche zur Zielsequenz.

4.5.3 Herstellung markerloser *knockout*-Mutanten

Um polare Effekte der Resistenzgenkassette auf die Nachbargene auszuschließen, war es notwendig markerlose Mutanten zu generieren. Die Eliminierung der Kanamycinresistenzgenkassette im STM Stamm 14028 *ychK::aph* Klon 1 und 14028 *yjjU::aph* Klon 1 erfolgte mit Hilfe der auf pCP20 kodierten FLP Rekombinase. Als Erkennungssequenzen für die FLP Rekombinase fungierten die zwei FRT Sequenzen, welche die Resistenzgenkassette flankieren (Abb. 4.19, B). Die positiven Stämme tragen die Bezeichnung 14028 $\Delta ychK::FRT$ Klon 1 und 2 bzw. 14028 $\Delta yjjU::FRT$ Klon 1 und 2, weil nach Entfernung der Resistenzgenkassette eine 84 bp große FRT-„Narbe“ verblieb, die als 155 bp großes Fragment amplifiziert wurde (Abb. 4.19, A). Die generierten Klone (jeweils Klonnr. 1) wurden für weitere Analysen verwendet.

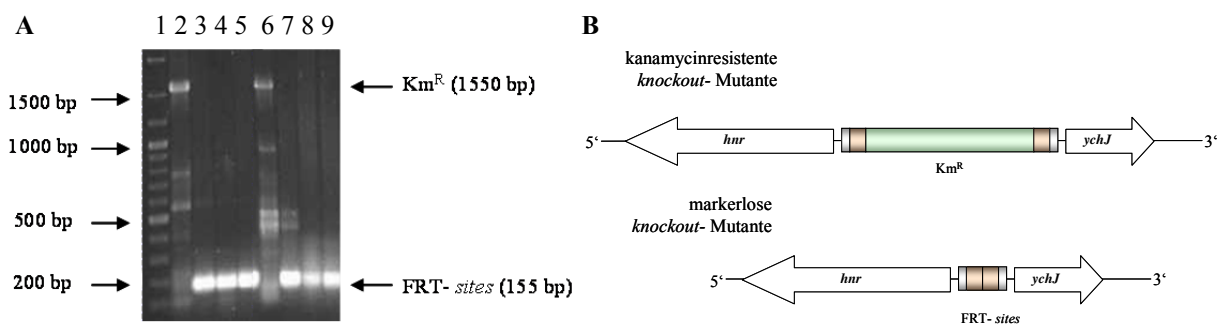


Abbildung 4.19: Verifizierung markerloser STM 14028 PLP *knockout*-Mutanten. (1) GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). 1%iges (w/v) Agarosegel der Kolonie-PCR. **A:** Spur 3 - 5 zeigen 155 bp großes Amplifikat mehrerer $\Delta yjjU::FRT$ Klone bzw. Spur 7 - 9 für mehrere $\Delta ychK::FRT$ Klone. Als Kontrollstämme sind in Spur 2 und 6 die Mutanten $\Delta yjjU::aph$ Klon 1 und $\Delta ychK::aph$ Klon 1 mitgeführt, die das amplifizierte 1,55 kb Fragment mit Km^R zeigen. **B:** Schematische Darstellung der chromosomalen Situation am Beispiel des *ychK* Mutantenstammes vor und nach der Eliminierung der Km^R . grün = Km^R ; orange = FRT-sites; grau = homologe Bereiche zur Zielsequenz.

4.5.4 Herstellung und Verifizierung einer PLP Doppel-*knockout*-Mutante

Zur Herstellung einer STM PLP Doppel-*knockout*-Mutante wurde in den bereits erzeugten und verifizierten markerlosen *knockout*-Stamm 14028 $\Delta yjjU::FRT$ Klon 1 mittels P22-Phagentransduktion eine weitere definierte Mutation eingebracht. Der Empfängerstamm wurde dazu mit dem P22-Lysat für *ychK::aph* transduziert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR verifiziert und die positiven PLP Doppel-*knockout*-Mutanten 14028 $\Delta yjjU::FRT ychK::aph$ Klon 1, 2 und 3 genannt (Daten nicht gezeigt).

4.6 Phänotypische Charakterisierung von *Salmonella* PLP *knockout*-Mutanten

Um die *Salmonella* PLP *knockout*-Mutanten für weitere Untersuchungen heranzuziehen wurde zunächst überprüft, ob die Mutationen *in frame* sind und somit nicht die Transkription der jeweiligen Nachbargene beeinflussen. Dazu wurden die entsprechenden Genbereiche der *knockout*-Mutanten sequenziert. Die Analyse der Sequenzen ergab sowohl in $\Delta yjjU::FRT$ Klon 1 wie auch in $\Delta ychK::FRT$ Klon 1 eine vollständige *in frame* Deletion der PLP Gene (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde für $\Delta ychK::FRT$ Klon 1 verifiziert, dass das putativ im Operon organisierte Folgegen *hnr* nicht von der Deletion betroffen ist. Dazu wurde die Bildung des *small colony morphology* Phänotyps untersucht (s. 4.4.2), der bei *hnr* (*mviA*) *knockout*-Mutanten entsteht [185-187]. Entsprechende Ergebnisse im Plattenausstrich ließen keinen veränderten Phänotyp erkennen, so dass vermutlich keine Beeinflussung des im Operon organisierten Folgegens besteht (Abb. 4.20).

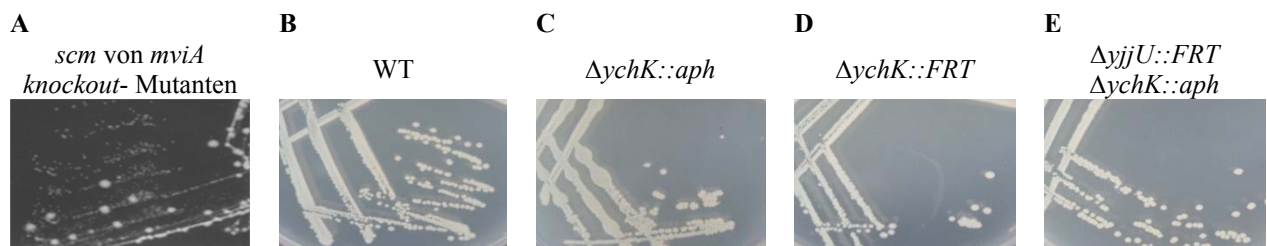


Abbildung 4.20: STM 14028 PLP *knockout*-Mutanten bilden keinen *small colony morphology* Phänotyp. Koloniemorphologie von STM Stämmen auf LB-Agarplatten nach ca. 18h Inkubation bei 37°C. **A:** *small colony morphology* (*scm*) Phänotyp einer STM SL1344 *mviA*::Km Mutante [185], Fehlender *scm* Phänotyp Nachweis bei **B:** STM 14028 WT, **C:** 14028 $\Delta ychK::aph$, **D:** 14028 $\Delta ychK::FRT$, **E:** 14028 $\Delta yjjU::FRT$ $\Delta ychK::aph$.

4.6.1 *Salmonella* PLP *knockout*-Mutanten vermehren sich in Laborkultur

Die generierten *Salmonella* PLP *knockout*-Mutanten wurden vergleichend zum *Salmonella* Wildtypstamm in ihrer Vermehrungseigenschaft überprüft. Hierzu wurden die Stämme in LB-Medium angeimpft und mittels Messung der Kulturdichte die Replikation der Bakterien untersucht. Alle getesteten *knockout*-Mutanten zeigten in LB-Kulturmedium wildtypstammähnliche Vermehrungseigenschaften in der Verzögerungs- (lag-) und exponentiellen (log-) Wachstumsphase und traten nach ca. 8h in die stationäre Phase ein, welche durch Wachstumsstagnation gekennzeichnet ist (Abb. 4.21).

ERGEBNISSE

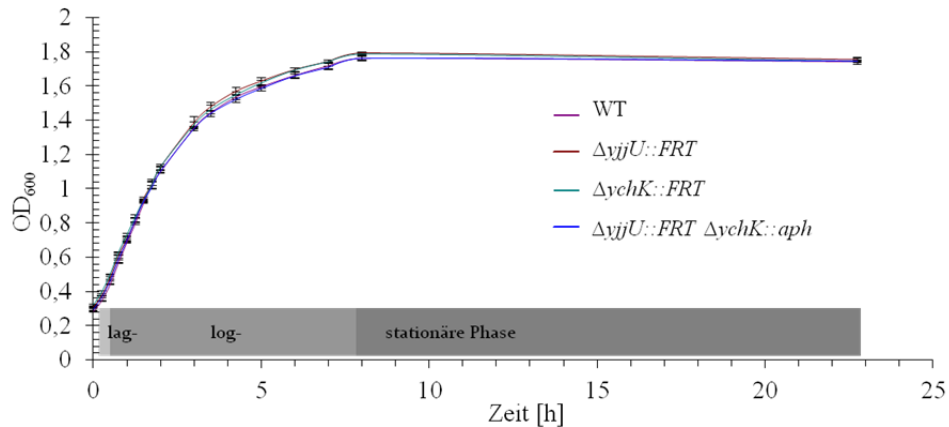


Abbildung 4.21: Wachstumsverhalten von STM 14028 und isogenen PLP *knockout*-Mutanten in LB-Medium. Alle Stämme zeigten gleiches Replikationsverhalten in der lag- und log-Wachstumsphase und traten nach ca. 8h in die stationäre Phase ein, wo das Wachstum stagnierte. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Es bestand durch die Mutation kein Defizit im Replikationsverhalten in LB-Flüssigmedium und die Stämme konnten für weitere Untersuchungen wie Aktivitätsassays und Infektionsstudien eingesetzt werden.

4.7 Untersuchung der lipolytischen Aktivität von PLP in *Salmonella*

Zu Beginn der Arbeit war die Funktion der Patatin-ähnlichen Proteine von STM völlig unklar. Auf Grund der Sequenzhomologie zu anderen bakteriellen PLP, wie *L. pneumophila* PatD oder *E. coli* RssA, wurde eine Phospholipaseaktivität vermutet und erwartet, dass diese in den *knockout*-Mutanten reduziert ist.

Zunächst wurde getestet, ob durch Salmonellen eine Lipolyse induziert werden kann. Dazu wurde die lipolytische Aktivität des *Salmonella* WT Stammes 14028 vergleichend zu den generierten isogenen Doppel- und Einzel-*knockout*-Mutanten im Lipidhydrolyseassay untersucht. Die Probennahme erfolgte zunächst aus der mittleren- (3h) und späten- (8h) log-Phase, sowie aus der stationären (24h) Wachstumsphase (s. Abb. 4.21), um den Assay zu optimieren. Zusätzlich wurden Zellpelletlysate und Kulturüberstände getrennt betrachtet, um Aufschluss über die sekretierte und Zellpellet-assoziierte Aktivität zu erhalten.

Die Kulturüberstände wie auch die Zellpelletlysate des WT sowie aller getesteten Mutanten setzten Fettsäuren aus den Substraten 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-1-Glyzerol (DPPG), 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-1-Phosphocholin (DPPC), 1-Palmitoyl-2-

ERGEBNISSE

Hydroxy-sn-Glyzero-3-Glyzerol (MPLPG) und 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin (MPLPC) frei (Daten z. T. nicht gezeigt) Der Lipidhydrolyseassay in *Salmonella* unterlag jedoch großen Abweichungen in der Messung der freien Fettsäuren, was die Reproduzierbarkeit einer erwarteten Verminderung der lipolytischen Aktivität der Mutanten im Vergleich zum WT nicht ermöglichte (s. Abb. 4.22, exemplarisch für 8h Zellpelletlysate gegenüber DPPG). Zudem fiel auf, dass die ermittelte Umsetzung freier Fettsäuren mit 0,2 – 0,4 FFA [mM] am Detektionsminimum lag.

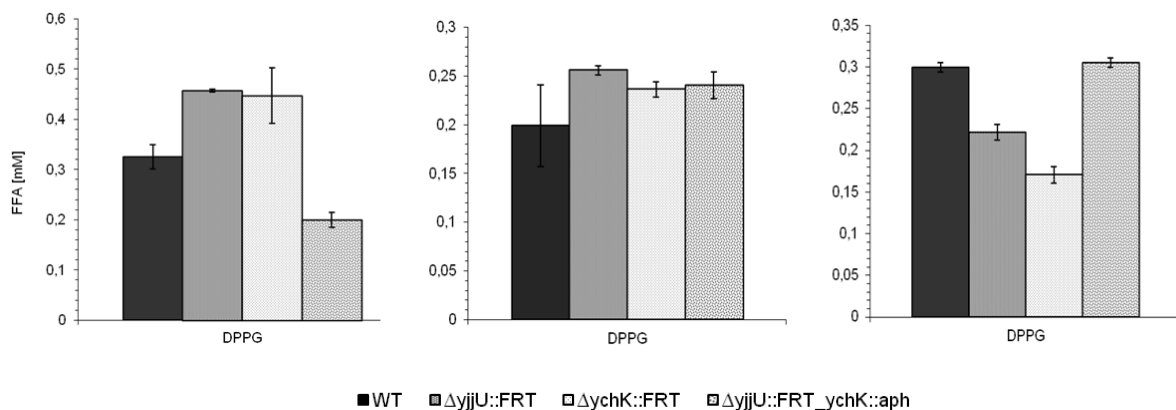


Abbildung 4.22: Analyse der lipolytischen Aktivität gegenüber DPPG von PLP in STM 14028 8h Zelllysaten. Die 8h Zellpelletlysate des 14028 WT Stammes sowie die isogenen Einzel- und Doppel-*knockout*-Mutante wurden im Lipidhydrolyseassay (24h) untersucht. Exemplarisch sind Resultate (Triplikate) gegenüber Phosphatidylglycerin (DPPG) aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt, welche die Schwankungen in der Messung der freien Fettsäuren (FFA) veranschaulicht.

Die Fähigkeit zur Lipidhydrolyse sollte nun mit isolierten Proteinen untersucht werden. Hierfür wurden die PLP Gene zunächst in einen Expressionsvektor kloniert.

4.8 Klonierung von STM *yjjU* und *ychK* in den pBAD-TOPO Vektor

Die Klonierung von *yjjU* und *ychK* in den pBAD-TOPO Vektor erfolgte ohne *Salmonella* Promoter. Durch die Klonierung kam es zu Proteinmodifikationen am C-Terminus, denn beiden PLP wurde je ein V5-Epitop und ein 6×His-tag angefügt (ca. 3,2 kDa). Das V5-Epitop diente dem Nachweis auf immunhistochemischer Ebene (wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt) und der 6×His-tag ermöglicht eine spezifische affinitätschromatographische Reinigung der Proteine. Die gereinigten Proteine können anschließend weiter biochemisch charakterisiert und deren Funktion sowie Lokalisation untersucht werden.

ERGEBNISSE

Das *yjjU*-Insert wurde mit den Klonierungsoligonukleotiden 1689/ 1695 und entsprechend das *yckK*-Insert mit 1688/ 1694 generiert (Tab. M 2.12) und mittels Gelelektrophorese die korrekte Größe des Amplifikats, für *yjjU* 1074 bp und *yckK* 906 bp, überprüft. Nach Klonierung und erfolgreicher Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen wurden die erhaltenen Kolonien mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des jeweiligen Inserts überprüft. Dabei konnte für den Leervektor mit den Oligonukleotiden 1947/ 1948 ein 326 bp großes Amplifikat nachgewiesen werden und für die erfolgreiche Insertion von *yjjU* ein 1400 bp bzw. für die *yckK* Insertion ein 1232 bp großes Fragment amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Putativ positive Klone wurden daraufhin mittels Sequenzierung auf die vollständig korrekte Insertion hin untersucht und die finalen positiven Konstrukte pKJ6 (pBAD_*yjjU*) und pKJ7 (pBAD_*yckK*) in *E. coli* BL21 transformiert. Insgesamt wurden vier positive BL21(pKJ6)- und fünf positive BL21(pKJ7)-Klone generiert, wobei im Folgenden mit dem jeweils ersten Klon weiter gearbeitet wurde.

4.8.1 Generierung von Mutanten im putativ katalytisch aktiven Serin von STM YjjU und YckK

PLP sind lipolytische Enzyme und sie besitzen anstatt einer katalytischen Triade eine katalytische Ser-Asp Diade (s. 1.2.4.1.1) [113-115]. Im YckK homologen Protein RssA von *E. coli*, ist das G-X-S-X-G Motiv in der katalytischen Diade enthalten, wobei das zentrierte Serin essentiell für die Proteinaktivität ist [191]. Um der Vermutung nach zu gehen, dass auch *Salmonella* YckK und YjjU, auf Grund ihrer Sequenzhomologie zu anderen bakteriellen PLP, wie RssA, Phospholipaseaktivität besitzen und ob das ebenfalls in Block II vorhandene G-X-S-X-G Motiv in der katalytischen Diade enthalten ist, wurden plasmidkodierte Serinmutanten der entsprechenden Proteine hergestellt.

Mittels *QuickChange* und Mutageneseoligonukleotiden für *yckK* 1678/ 1679 und für *yjjU* 1699/ 1696 wurden Punktmutationen erzeugt. Es wurde das Thymin an Position 181 in *yjjU* und 121 in *yckK* zu Guanin mutiert. Daraus resultiert ein Aminosäureaustausch im Protein von Serin zu Alanin an Position 41 (YckK) und Position 61 (YjjU). Putativ positive Klone wurden mittels Sequenzanalyse auf Vorhandensein der Punktmutation überprüft und in *E. coli* BL21 transformiert. Die finalen positiven Klone wurden als BL21(pKJ6-S = YjjU^{S61A}) Klon 1 und BL21(pKJ7-S = YckK^{S41A}) Klon 1 bezeichnet (Tab. M 2.15) und im Folgenden weiter verwendet.

4.9 Untersuchung der lipolytische Aktivität von PLP in *E. coli*

Die Testung der lipolytischen Aktivität von PLP in *Salmonella* lieferte keine reproduzierbaren signifikanten Veränderungen der Mutanten im Vergleich zum WT (s. 4.7). Daher sollte die Lipidhydrolyse nach Expression der entsprechenden Gene in *E. coli* durchgeführt werden und Aufschluss über die enzymatische Aktivität der STM PLP geben. Hierzu wurden zunächst der *E. coli* Kontrollstamm BL21 und die zu untersuchenden Stämme BL21(pKJ6) Klon 1 und BL21(pKJ7) Klon 1 für 3h überexprimiert und die Zelllysate anschließend im Enzymassay untersucht (Abb. 4.24).

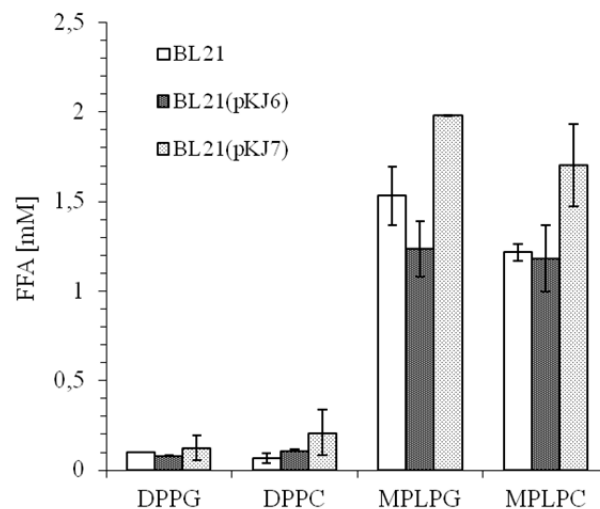


Abbildung 4.23: Testung der lipolytische Aktivität von STM PLP in *E. coli*. Der plasmidfreie *E. coli* Kontrollstamm BL21 wurde ebenso wie BL21(pKJ6 = YjjU-V5/6×His) Klon 1 und BL21(pKJ7 = YchK-V5/6×His) Klon 1 für 3h mit Arabinose induziert und Proteine exprimiert. In der anschließenden Lipidhydrolyse wurden die Zelllysate untersucht. Der BL21 Stamm hatte selbst viel enzymatische Aktivität, was die Auswertung erschwerte und zu Ungenauigkeiten führte. Eine Reinigung der Proteine war unabdingbar zur Bestimmung der tatsächlichen lipolytischen Aktivität. Die Daten repräsentieren Triplikate aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Lipidhydrolyse mit *E. coli* BL21 Zelllysaten ließ keine Auswertung für YjjU zu, da der plasmidfreie *E. coli* selbst eine enzymatische Aktivität im Assay zeigte, welche die putative lipolytische Aktivität von YjjU überlagerte. YchK zeigte in diesem Assay eine Lysophospholipase A-Aktivität an MPLPG und MPLPC. Jedoch war die Auswertung möglicherweise verfälscht bzw. ungenau, auf Grund der eigenen enzymatischen Aktivität des Expressionsstammes. Infolgedessen wurden die PLP in *E. coli* überexprimiert, mit dem C-terminalen V5/ 6×His-tag spezifisch affinitätschromatographisch gereinigt und im Anschluss in der Lipidhydrolyse getestet.

4.9.1 Reinigung der 6×His-getagten Proteine

Für eine Reinigung empfiehlt es sich die Protein in großer Menge vorliegen zu haben, was mit einer Überexpression erreicht wird. Um für die PLP geeignete Expressionsbedingungen zu finden wurden diese in einem Vorversuch bei verschiedenen Zeiten (3h, 5h, 16h) und Temperaturen (18°C, 25°C, 37°C) überexprimiert und anschließend mittels Western Blot bestimmt, dass bei 37°C nach 3h die beste Überexpression der rekombinanten Proteine stattfand (Daten nicht gezeigt) und diese Bedingungen im Weiteren verwendet wurden.

Nach Überexpression und anschließender Reinigung der PLP mit C-terminalem V5/ 6×His-tag über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie wurden die eluierten Fraktionen in einer SDS-PAGE über Molekulargewichtsvergleiche auf das Vorhandensein des Proteins überprüft. In Abbildung 4.24 (A) ist der Reinigungsverlauf aller vier Proteine chromatographisch dargestellt. Die Elution der Proteine wird mit einem Peak veranschaulicht („→“). Die gereinigten YchK-V5/ 6×His Proteine sollten sich demnach in den Fraktionen 43 bis 45 befinden und die YjjU-V5/ 6×His Proteine in Fraktion 49 bis 52.

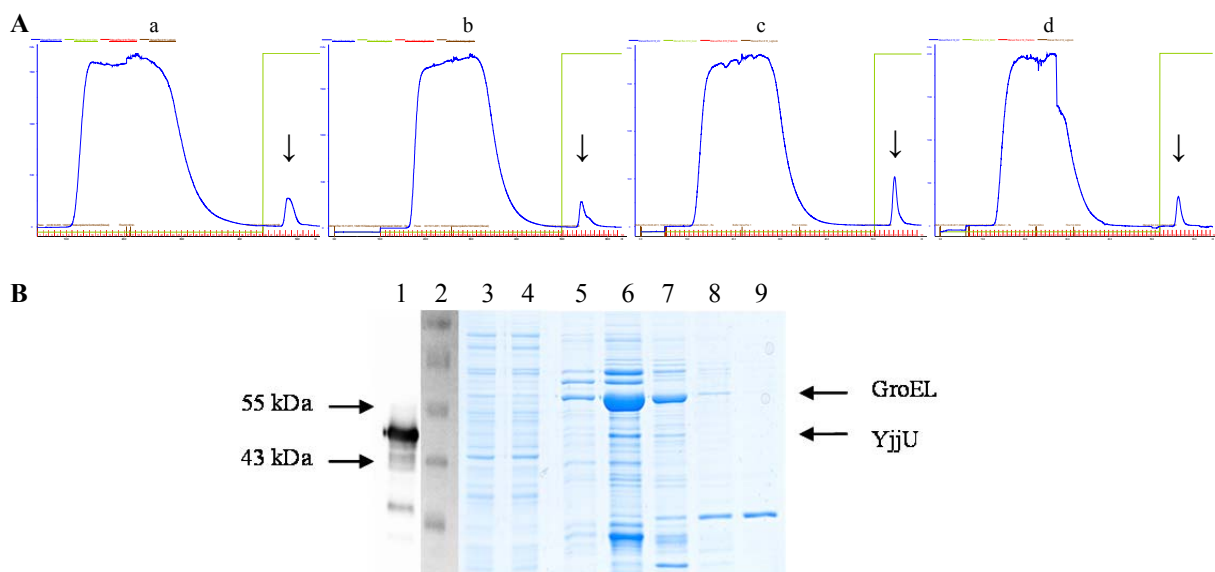


Abbildung 4.24: Affinitätschromatographische Reinigung aller STM PLP und Nachweis von YjjU-V5/ 6×His im Western Blot und SDS-PAGE. A: Nach Zellaufschluss wurde der Überstand einer 250 ml *E. coli* Überexpressionskultur auf eine HisTrap™ 1ml Säule geladen und mit steigendem Imidazolanteil im Puffer eluiert. Auf der X-Achse sind die einzelnen Fraktionen (je 1ml) eingetragen. Chromatogramm des Reinigungsverlaufs vom rekombinanten YchK-V5/ 6×His aus BL21(pKJ7) Klon 1 (a), YchK^{S41A}-V5/ 6×His aus BL21(pKJ7-S) Klon 1 (b), YjjU-V5/ 6×His aus BL21(pKJ6) Klon 1 (c), YjjU^{S61A}-V5/ 6×His aus BL21(pKJ6-S) Klon 1 (d). B: (2) Prestained Marker. (1) YjjU-V5/ 6×His Nachweis im Western Blot mit α-His-Antikörper, exposure 1sec. (3) YjjU-V5/ 6×His Nachweis mittels SDS-PAGE vor der Reinigung, (4) im Durchfluß und in den eluierten Fraktionen 49 (5), 50 (6), 51 (7), 52 (8) und 53 (9). Für die Nachweise wurden jeweils 5µl der Elutionsfraktion verwendet.

ERGEBNISSE

Wie sich herausstellte war ein Nachweis der PLP mittels SDS-PAGE nur bedingt möglich, da in den eluierten Fraktionen noch viele Nebenbanden zu finden waren und sich keine dominante Proteinbande in der vorhergesagten Molekulargröße der PLP nachweisen ließ. Die Identifizierung der richtigen PLP Proteinbande in der SDS-PAGE war nur über vergleichende Betrachtung der Western Blot Ergebnisse möglich (Abb. 4.24 (B)). Zur Verifizierung der vermuteten YjjU-V5/ 6×His enthaltenden Gelbande wurde diese bei ca. 43 kDa und die dominante Bande bei ca. 58 kDa ausgeschnitten und im Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig mittels Massenspektrometrie analysiert. Die gelieferten Ergebnisse bestätigten, dass es sich bei dem 43 kDa großen Protein um das erwartete YjjU aus *Salmonella* handelte. Die Analyse der zweiten Bande ließ GroEL von *E. coli* identifizieren. GroEL ist das wichtigste Hitzeschockprotein von *E. coli* und gehört zu der Chaperon-(HSP60) Familie. Das 57,3 kDa Protein verhindert u. a. die Fehlfaltung von Proteinen und fördert die Rückfaltung von entfalteten Polypeptiden [192].

Analog konnten die rekombinanten Proteine YjjU^{S61A}-V5/ 6×His (ca. 43 kDa, Daten nicht gezeigt), sowie YchK-V5/ 6×His und YchK^{S41A}-V5/ 6×His in Höhe von ca. 36 kDa im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.25).

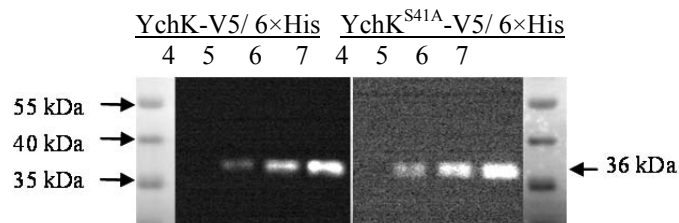


Abbildung 4.25: Nachweis des rekombinanten STM PLP YchK-V5/ 6×His und YchK^{S41A}-V5/ 6×His. Jeweils 5µl der Elutionsfraktionen 4 - 7 wurden mit Lämmli-puffer versetzt und die Proteine in einer denaturierenden SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließendem Western Blot mit α -His-Antikörper und Detektion wurden die Proteinbanden für YchK-V5/ 6×His und Mutante in Höhe von 36 kDa sichtbar. Das Molekulargewicht wurde mit dem Prestained Marker von Fermentas ermittelt. (Exposure: 1sec).

Die gereinigten PLP Proteine sollten anschließend im Lipidhydrolyseassay auf deren lipolytische Aktivität untersucht werden.

4.9.2 Lipolytische Aktivität der rekombinanten Patatin-ähnlichen Proteine

Aufgrund der unzulänglichen Reinigung mittels Affinitätschromatographie, konnte keine genaue Proteinkonzentration bestimmt werden. Um für die Untersuchung der lipolytischen

ERGEBNISSE

Aktivität eine äquivalente Menge an PLP einzusetzen, wurden die PLP Proteinmengen im Western Blot eingestellt. Aufgrund der vergleichbaren Bandenstärke konnte man von einer äquivalenten Menge an Protein in den Proben ausgehen (Abb. 4.26), welche für den anschließenden Enzymassay eingesetzt wurden.

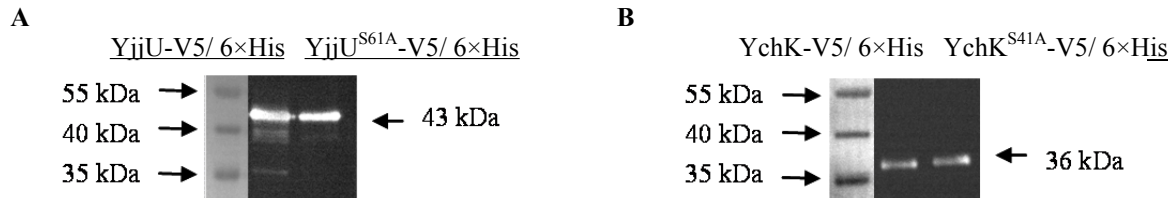


Abbildung 4.26: Vergleichender Western Blot der gereinigten rekombinanten STM PLP. Für die Western Blot Analyse wurden die PLP-enhaltenen Fraktionen so gewählt, dass eine vergleichbare Bandenstärke an detektiertem Protein nachgewiesen wurde, **A:** das 43 kDa große YjjU-V5/ 6xHis und isogene Serinmutante (Exposure: 10sec), **B:** das 36 kDa große YchK-V5/ 6xHis und Serinmutante (Exposure: 30sec). Das Molekulargewicht wurde mit dem Prestained Marker von Fermentas ermittelt.

In der Lipidhydrolyse wurde für YjjU-V5/ 6xHis deutlich enzymatische Aktivität an vorwiegend DPPG aber auch an DPPC, MPLPG und MPLPC gezeigt. Die Umsetzung der Substrate in messbare freie Fettsäuren konnte nur durch eine aktive Phospholipase entstanden sein. Im Vergleich zum Wildtypprotein konnten in den Ansätzen mit der YjjU^{S61A}-V5/ 6xHis Mutante, mit einem mutierten Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G zu G-X-A-X-G, keine freien Fettsäuren gemessen werden (Abb. 4.27, A).

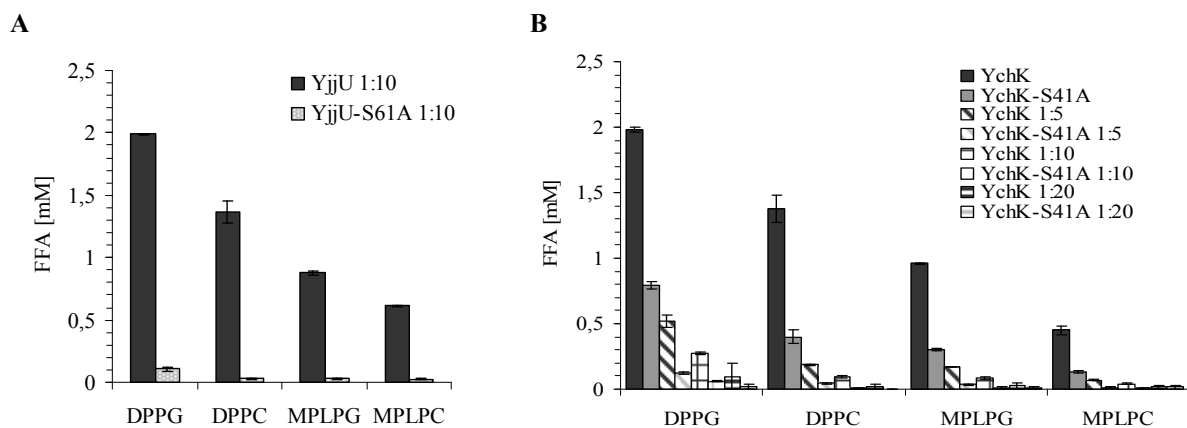


Abbildung 4.27: Analyse der lipolytischen Aktivität gereinigter STM PLP. Die WT-Proteine YjjU-V5/ 6xHis und YchK-V5/ 6xHis zeigten erhöhte PLA Aktivität, die Mutation im katalytisch aktiven Serin bewirkt eine reduzierte lipolytische Aktivität für YjjU^{S61A}-V5/ 6xHis und YchK^{S41A}-V5/ 6xHis. Die als Substrat dienenden Lipide Phosphatidylglycerin (DPPG), Phosphatidylcholin (DPPC), Lysophosphatidylglycerin (MPLPG) und Lysophosphatidylcholin (MPLPC) wurden jeweils mit gereinigtem, (verdünnten) PLP für 1h bei 37°C inkubiert und die freigesetzten Fettsäuren detektiert. Pufferkontrollen wurden von den Messwerten abgezogen. Die Daten repräsentieren Triplikate aus drei unabhängigen Experimenten.

ERGEBNISSE

Die YchK-V5/ 6×His Proteine wurden unverdünnt und in Puffer je 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt für den Enzymassay verwendet, um die Lipidhydrolyse zu optimieren. Auch YchK-V5/ 6×His zeigte, analog zu YjjU-V5/ 6×His, nach 1h Inkubation Phospholipase Aktivität. Die Serinmutante mit YchK^{S41A}-V5/ 6×His wies eine signifikant reduzierte lipolytische Aktivität auf (Abb. 4.27, B).

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die *Salmonella* PLP YjjU und YchK Phospholipasen sind und Phospholipase A (PLA)-Aktivität gegenüber den Substraten DPPG, DPPC, sowie Lysophospholipase A-Aktivität gegenüber MPLPG und MPLPC besitzen. Die Vermutung, dass das G-X-S-X-G- Motiv in der katalytischen Diade enthalten ist und das zentrale Serin zur Entwicklung der lipolytischen Aktivität benötigt wird, konnte durch die signifikant reduzierte PLA Aktivität von YjjU^{S61A}-V5/ 6×His und YchK^{S41A}-V5/ 6×His bestätigt und eine eindeutige Zuordnung der Phospholipaseaktivität zur Patatindomäne des Proteins gezeigt werden.

4.10 Untersuchung der PLP Sekretion in *Salmonella*

Phospholipasen, wie Patatin-ähnliche Proteine, existieren in intrazellulärer und extrazellulärer Form. Die plasmidkodierte Proteine wurden genutzt, um die Sekretion der STM PLP zu untersuchen und Aufschluss über eine sekretierte oder Zellpellet-assoziierte Aktivität zu erhalten.

Dazu wurden die erzeugten Plasmide (siehe 4.8) in STM 14028 elektroporiert und die erhaltenen Transformanten STM 14028(pKJ6) und STM 14028(pKJ7) bezeichnet. Beide PLP konnten nach Überexpression für 3h bzw. 5h im Zelllysats, jedoch nicht in den 10-fach konzentrierten Kulturüberständen nachgewiesen werden (Abb. 4.28), d. h. unter den gewählten Bedingungen konnte keine Sekretion in den Kulturüberstand gezeigt werden. Es fällt jedoch auf, dass nach 3h Expressionszeit mehr Protein im Zelllysats detektiert werden konnte als nach 5h. Die PLP verfügen über einen C-terminalen V5/ 6×His-tag, welcher eine mögliche Sekretion über eine N-terminale Signalsequenz jedoch nicht behindern sollte. Eine generelle Sekretion der PLP konnte folglich nicht ausgeschlossen werden.

ERGEBNISSE

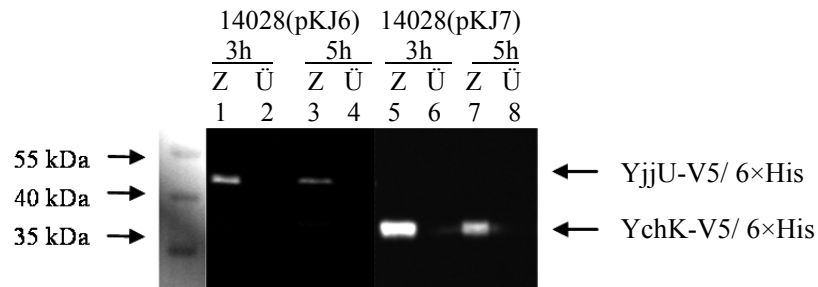


Abbildung 4.28: Western Blot Analyse zum Sekretionsnachweis der PLP in *Salmonella*. Jeweils nach 3h bzw. 5h Expressionszeit wurden die Zelllysate und Kulturüberstände der Stämme 14028(pKJ6) Klon 1 und 14028(pKJ7) Klon 1 gewonnen. In den löslichen Zelllysaten (1, 3, 5, 7) konnten in beiden Stämmen zu beiden Expressionszeiten das jeweilige PLP mittels α -His-Detektion nachgewiesen werden, wobei YjjU-V5/ 6 \times His 43 kDa (1, 3) groß ist und YchK-V5/ 6 \times His 36 kDa (5, 7). Das Molekulargewicht wurde mit dem Prestained Marker von Fermentas ermittelt. Exposure: 10sec. Z=lösliche Zelllysate, Ü=10-fach konzentrierter Kulturüberstand. Die Daten repräsentieren zwei unabhängige Experimente.

4.11 Analyse der PLP Mutanten in verschiedenen Infektionsmodellen

In Mikroben spielen Phospholipasen eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren. Für das *L. pneumophila* PLP VipD/ PatA beispielsweise wird eine Virulenz-assoziierte Rolle in der Manipulation des Wirtszell-Vesikeltransportes beschrieben [193]. Auch ExoU trägt maßgeblich zur Virulenz und akuten *P. aeruginosa* Infektion bei [194, 195].

Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass auch YjjU und YchK zu den Phospholipasen zählen und PLA Aktivität besitzen (s. 4.9.2). Um zu testen, ob die PLP entscheidend zum Infektionsverhalten der Salmonellen beitragen, wurden die erzeugten PLP *knockout*-Mutanten (s. 4.5) in verschiedenen Infektionsmodellen untersucht.

Im Makrophagen- und Epithelzell-infektionsmodell wurde die Replikations- und Invasionsfähigkeit der *Salmonella* PLP *knockout*-Mutanten in Wirtszellen getestet. Der STM 14028 Wildtypstamm vermehrte sich in beiden Infektionsmodellen intrazellulär über 24h um 1 bis 1½ Zehnerpotenzen. Der Kontrollstamm STM 14028 MvP818 trägt ein mutiertes Gen, $\Delta invC$ [161], weshalb er weniger invasiv ist. Der Stamm war vermindert zur aktiven Infektion der Makrophagen fähig und zeigte in der HeLa-Epithelzellinfektion wie erwartet einen deutlichen Invasionsdefekt. Der zweite Kontrollstamm STM 14028 P2D6 mit $\Delta ssaV$ zeigte sowohl in Makrophagen wie auch in Epithelzellen eine erwartete reduzierte Replikation über 24h Infektionsdauer. Die zu untersuchenden PLP Einzel- und Doppel-*knockout*-Mutanten zeigten in beiden Infektionsmodellen keinen attenuierten Phänotyp und verhielten sich äquivalent zum Wildtypstamm in der intrazellulären Vermehrung und Invasion (Abb. 4.29).

ERGEBNISSE

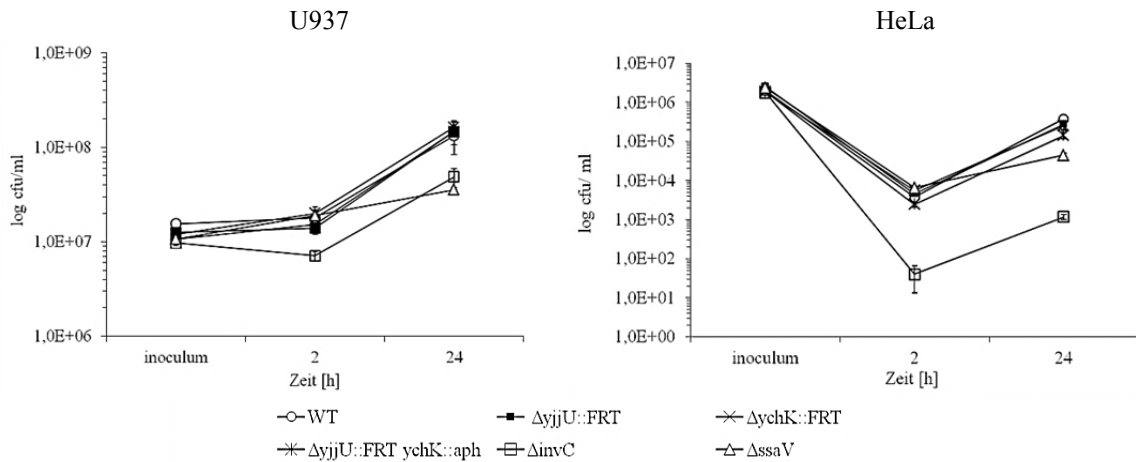


Abbildung 4.29: STM 14028 PLP Mutanten sind in etablierte Infektionsmodellen nicht attenuiert. Die Infektionen wurden mit einer MOI 10 durchgeführt. Kontrollstämme zeigten in beiden Infektionsmodellen reduzierte Invasions- ($\Delta invC$) und Replikationsfähigkeit ($\Delta ssaV$). Für die STM14028 PLP Mutanten ist keine Attenuation der Invasion und Replikation in humanen U937-Makrophagen sowie HeLa-Epithelzellen nachgewiesen. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die STM PLP weder im humanen U937-Makrophagen- noch im HeLa-Epithelzellinfektionsmodell essentiell für die Invasion und Replikation waren. In anderen Infektionsmodellen könnten die STM PLP aber eine entscheidende Rolle spielen. Erste Anzeichen dazu liefert die Studie von Chaudhuri *et al* (2009) [196], der einen möglichen Einfluss von *ychK* in der Mausinfektion vermuten lässt. In einem quantitativen Screen wurden Transposonmutanten identifiziert, die im Mausmodell attenuiert sind. Dabei wurde *ychK* als ein Gen identifiziert, welches für die Infektion von Mäusen durch *Salmonella Typhimurium* notwendig sein könnte.

Abschließend ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass STM die Patatin-ähnlichen Proteine Ychk und YjjU besitzt. Diese Enzyme Phospholipase A-Aktivität vorwiegend gegenüber dem Substrat DPPG, aber auch gegenüber DPPC, sowie Lysophospholipase A-Aktivität an MPLPG und MPLPC aufweisen. Das zentrale Serin im G-X-S-X-G Motiv ist hierbei essentiell für die lipolytische Aktivität. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf keine Sekretion der Proteine hin und *in vitro* Studien zeigten, dass *ychK* und *yjjU* in humanen Infektionsmodellen nicht essentiell sind. Zukünftig sollte geklärt werden, ob sie *in vivo* eine entscheidende Rolle im Infektionsverhalten der Salmonellen spielen.

5. Diskussion

5.1 Identifizierung neuer *Salmonella* Typhimurium Virulenzgene mit Bedeutung für die Wirtszellinfektion

5.1.1 Screen auf *Salmonella* Suszeptibilität gegenüber Amöben

Salmonella Typhimurium besitzt, zusätzlich zu seinem pathogenen Potential, eine hohe Anpassungsfähigkeit an verschiedene Wirte und das Überleben in der Umgebung. Während der Umweltpassage oder im Darm treffen Salmonellen auf Protozoen, wie z. B. Amöben, die sich in der Regel von Bakterien ernähren. Viele pathogene Bakterien haben Strategien entwickelt, um einer Amöbenprädation und Verdauung zu widerstehen. Für Salmonellen wurde die Resistenz gegenüber Amöben und eine intrazelluläre Replikation in den Protozoen bereits beschrieben [17-19]. Von der Nutzung solcher Umweltwirte können Salmonellen in mehrfacher Hinsicht profitieren: die intrazelluläre Lokalisation innerhalb der Amöben schützt den Eindringling vor äußeren Gefahren, wie Veränderungen der Umwelt oder Behandlungen mit bakterienschrädlichen Substanzen [46], die Amöben sind Überträger von Bakterien und dienen deren Verbreitung, und die Passage durch Amöben erhöht die Invasivität und Virulenz der Bakterien auch für menschliche Zellen [20].

Es sind bereits mehrere Studien durchgeführt worden, in denen Amöbenarten in der Interaktion mit Bakterien als Wirtszellmodell genutzt wurden, um bakterielle Virulenzfaktoren zu identifizieren. Durch einen Mutantenscreen mit *Vibrio cholerae* in *Dictyostelium discoideum* konnte so ein neues bakterielles Sekretionssystem gefunden werden [197]. Für *Legionella pneumophila* erwies sich ein Agarplatten-Assay (Scatter Screen) mit *A. castellanii* ATCC Amöben als funktionell, um neue Virulenzfaktoren zu identifizieren [152]. Diese und weitere Studien mit *Acanthamoeba* spp. zeigten, dass diese Amöben mit Bakterien in einer Weise interagierten, die analog zu der Interaktion zwischen Makrophagen und Bakterien ist [198, 199]. Aufgrund der Parallelen einer Amöben- und Humanmakrophageninfektion entstand die Idee, mit Hilfe eines Amöbenscreens zum einen wichtige Gene für die Salmonellen-Amöben-Interaktion zu identifizieren, die zum anderen auch potentielle Virulenzfaktoren sein könnten, die in der Interaktion von Salmonellen mit menschlichen Wirtszellen beteiligt sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der für

DISKUSSION

L. pneumophila etablierte Scatter Screen genutzt [152]. Im Vordergrund bei der Wahl des Screening Verfahrens standen ein technisch einfach durchführbarer Versuchsablauf und eine hohe Durchsatzrate sowie Effizienz. In dem Screen auf bakterielle Suszeptibilität gegenüber Amöben konnten zwei *Salmonella* Typhimurium Tn5-mutagenisierte Klonbänke in der Interaktion mit *A. castellanii* ATCC getestet werden (4.1.3). Aufgrund der Transposoninsertion entfiel ein wichtiges Genprodukt, was bei putativ amöbensensitiven *Salmonella* Kolonien in der Bildung des „strahlenförmigen“ Scatterphänotyps resultierte (4.1.2).

Um die Transposoninsertionen im Genom der Scattermutanten zu lokalisieren, wurde die inverse PCR Technik genutzt. Der große Vorteil der inversen PCR ist, dass hier eine auf die Base genaue Festlegung der Insertionsstelle auf dem Chromosom möglich ist. Jedoch konnte nicht bei allen Scatterklonen der Insertionsort des Transposons bestimmt werden. Auf Grund der Komplexität des Verfahrens und der Gliederung in mehrere Arbeitsschritte (Isolierung der genomischen DNA, Restriktionsverdau, Selbstligation, PCR) wird eine Erfolgsrate für ca. die Hälfte der Fälle erwartet [153]. Der Erfolg der PCR hängt dabei von unterschiedlichen Faktoren, z. B. Restriktionsenzymen ab. Generell werden Restriktionsenzyme mit 4 bp Erkennungsmotiven verwendet, da sie häufig im Genom schneiden. Wenn die Restriktionsschnittstelle zu nah oder zu weit von dem Transposon entfernt liegt, kann das die Leistung der Zirkularisierung (intramolekulare Ligation) vermindern oder aber zum Ausbleiben der PCR-Reaktion führen [153]. Möglicherweise können die ausstehenden Insertionsorte durch den Einsatz weiterer Restriktionsenzyme bestimmt werden. Zudem kann die Effizienz der PCR durch die Amplifikation von linearen und nicht zirkulären Molekülen verbessert werden, wie eine Studie verdeutlicht [153, 200]. Alternativ kann eine Single-Primer-PCR eingesetzt werden, um weitere Insertionsorte zu bestimmen. Dazu wird eine PCR mit nur einem Oligonukleotid und drei verschiedenen, in drei PCR-Reaktionen hintereinandergeschalteten Annealing-Temperaturen angesetzt, so dass dieses Oligonukleotid abwechselnd spezifisch und unspezifisch binden kann [201].

Für die Klone deren genauer Transposoninsertionsort bestimmt und verifiziert werden konnte, wurden sowohl bekannte als auch uncharakterisierte Gene identifiziert. Zu den bereits bekannten Virulenzgenen gehörte *purD*. Dieses Gen von STM kodiert für ein Enzym des *de novo* Purinnukleotidmetabolismus, der Phosphoribosylaminylinligase. Diese wurde schon bei *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* als Virulenzfaktor beschrieben, bezüglich der Infektivität

DISKUSSION

dieses Bakteriums gegenüber Reispflanzen [202]. Die Autoren führen den Virulenzdefekt auf die entstandene Auxotrophie der Bakterien zurück. Diese sind nicht mehr in der Lage, alle Nukleotide selbst zu synthetisieren und finden sich demnach in der infizierten Zelle unter restriktiven Bedingungen wieder. Ähnliches ist auch für purinauxotrophe Mutanten von STM bekannt, deren Infektivität gegenüber Makrophagen verringert ist, die betroffenen Gene jedoch nicht weiter beschrieben wurden [159]. Ein weiterer bekannter Virulenzfaktor ist das *lpfE* Gen. Das Fimbrien Operon *lpf* besteht aus fünf *open reading frames*, bezeichnet als *lpfABCDE*. Die langen polaren Fimbrien sind für die Invasion von murinen PEYERschen Plaques notwendig [203, 204]. Bei einem anderen Klon wurde *udg* identifiziert, welches das Enzym UDP-Glucose/ GDP-Mannose Dehydrogenase kodiert. Dieses gehört zu einer kleinen Gruppe von Enzymen, die über eine breite Palette von Funktionen verfügen und sowohl in Pflanzen als auch in Bakterien zu finden sind. So ist die UDP-Glucose-Dehydrogenase ein wichtiges Enzym in der Synthese von Hemicellulose und Pektin, welche beim Zellwandaufbau der Pflanzen benötigt werden. Beim Zebrafisch hingegen ist das Enzym für die Herzklappen-Bildung wichtig und in *Xanthomonas campestris*, einem Pflanzen-Pathogen, ist die UDP-Glucose-Dehydrogenase für die Virulenz erforderlich [205-207] (4.1.5). In *Salmonella* wird dieses Enzym für die Synthese von 4-Aminoarabinose benötigt, welche Lipopolysaccharide modifiziert und dem Organismus Resistenz gegenüber Antibiotika, wie Polymyxin B verleiht, wodurch Bakterien das Überleben innerhalb der Makrophagen ermöglicht wird [208-210].

Durch die Identifikation von bereits bekannten Virulenzgenen schien sich der Amöbenscreen mit Salmonellen als funktionell zu bestätigen. Auffällig war jedoch, dass keine publizierten SPI-kodierten Virulenzgene von der Transposoninsertion betroffen waren, obwohl beispielsweise von Bleasdale *et al* (2009) beschrieben wurde, dass das SPI-2 kodierte T3SS und die darüber sekretierten Effektoren wesentlich am Überleben von *S. Typhimurium* in freilebenden Amöben beteiligt sind [19]. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von SPI-Mutanten könnte in den gewählten Testbedingungen zu finden sein. Möglicherweise werden SPI-1 und SPI-2 kodierte Gene bei 25°C anders reguliert und weniger stark exprimiert als bei 37°C, welche das Temperaturoptimum des intrazellulären Pathogens darstellt [211, 212]. Zudem werden SPI-1 kodierte Gene durch Bedingungen, die denen des Verdauungsapparates ähneln aktiviert [213, 214]. Auch die SPI-2 kodierten Gene werden durch spezielle Umgebungsfaktoren wie z. B. geringen Magnesium- oder Calcium-Gehalt sowie Phosphatmangel aktiviert [52, 215, 216]. Die Regulation der SPI-Gene erfolgt letztlich über

DISKUSSION

Stimuli aus der umgebenden Umwelt des Bakteriums, die im agarbasierten Assay nicht gegeben sind.

Zusätzlich zur Tn5-Lokalisationsstudie, zeigten auch die Western Blot Analysen aller 60 Scatterklone, dass das SPI-1 kodierte T3SS nicht von der Transposoninsertion betroffen war und die darüber sekretierten Effektorproteine SopB, AvrA, SptP, SopD, SopA und SopE/ E2 in den Kulturüberstand transloziert wurden (4.1.4). Bei dieser Analyse wurde bei wenigen Scatterklonen eine vom Wildtypstamm abweichende Menge an sekretiertem Protein nachgewiesen. Beispielsweise zeigte die *STM2901::Tn5* Mutante mit 25 - 50µg/ ml Überstand die geringste Menge an sekretiertem SopA im STM LT2 Stamm (4.1.4). Eine mögliche Erklärung dafür, könnten vom Transposon verursachte polare Effekte auf den benachbarten *inv* Locus liefern. Beispielsweise könnte InvB beeinflusst werden, ein SPI-1 kodiertes Chaperon was für die Stabilität von SopA und SopE2 im bakteriellen Zytosol wichtig ist und ebenso für deren Transport via Typ-III-Sekretionsapparat [217].

Der *Salmonella* Typhimurium Stamm LT2 trägt, im Gegensatz zum SL1344 Stamm kein *sopE*, weshalb das entsprechende Protein nicht im Western Blot nachgewiesen werden konnte. SopE ist ein Aktivator für die zelluläre Rho GTPase Cdc42 [89]. Über einen „Trigger“-Mechanismus trägt der Effektor zur Änderung des Aktinzytoskeletts bei [218] und erleichtert durch die Induktion von sogenannten *membrane ruffles* die Invasion in nicht-phagozytierende Zellen. Obwohl die Induktion solcher Membranveränderungen nicht essentiell für die Aufnahme der Erreger ist [219], sind SopE/ E2 Doppelmutanten weniger invasiv auf Grund der eingeschränkten Bildung dieser Formationen [89]. Für mehrere Scatterklone wurde weder eine SopE- noch SopE2-Sekretion nachgewiesen und daher ein Invasionsdefizit dieser Klone in der Epithelzellinfektion vermutet. Jedoch konnte diese Hypothese bei keinem Klon für das hier verwendete Infektionsmodell bestätigt werden. Erklären lässt sich dieses durch die redundante Funktion der SPI-1 Effektorproteine. Wie in Zellkultur-Zellinvasionsexperimenten gezeigt agieren diese Proteine in einem „Konzert“, um die Wirtszelle zu manipulieren [92, 99, 220, 221]. In ähnlicher Weise agieren auch mehrere Effektorproteine im Rinder-Salmonellen-Infektions Modell [222].

Auch in weiteren Klonen wurde eine zum Wildtypstamm abweichende sekretierte Effektorproteinmenge nachgewiesen. Daher ist eine weitere Erklärung zum Nachweis der teilweise unterschiedlich detektierten Effektorproteinmenge in den Testbedingungen und der Bindungsaffinität der polyklonalen Antikörper zu finden, die lediglich eine semiquantitative Bestimmung der Proteinmenge zulassen.

DISKUSSION

Im Fokus dieser Arbeit standen jedoch solche Gene, die völlig uncharakterisiert waren bzw. deren Funktion zuvor nicht mit Virulenz in Verbindung gebracht wurde. Ein solches im Screen identifiziertes Gen ist *STM2901*. Das Gen kodiert ein putatives zytoplasmatisches Protein, welches auf der SPI-1 lokalisiert ist und sich *downstream* vom *inv* Locus befindet. Ebenso wie *udg* (4.1.5) stellt *STM2901* ein putatives PmrAB Target [208-210] dar. Das PmrAB Zwei-Komponenten regulatorische System ist in *S. Typhimurium* für die Virulenz notwendig [223-225]. Bemerkenswert ist zudem, dass im Screen vermehrt Gene identifiziert wurden, die im Zusammenhang mit Stoffwechsel- und Ernährungsfunktionen stehen. Darunter zählen solche, die im Zuckermetabolismus verankert sind, auch verschiedene Transporter-kodierende Gene sind in diesem Zusammenhang zu nennen (4.1.5). Der Transport von Aminosäuren ist ebenfalls ein wichtiges Element des bakteriellen Stoffwechsels, da viele Aminosäuren gute Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Energiequellen sind, deren Aufnahme energetisch günstiger ist als deren Synthese [226]. Insgesamt ließen diese Beobachtungen vermuten, dass die Funktionen für die volle Virulenz bzw. Widerstandsfähigkeit von Salmonellen in der Interaktion mit Amöben essentiell sind.

Vermutlich replizieren sich Salmonellen, wie Legionellen, in einer ähnlichen Weise in Amöben und menschlichen Zellen (z. B. Makrophagen), da in beiden Wirtszellen die Infektion in Phagosomen stattfindet [18, 19, 53, 54, 167], wo u. a. Nährstoffmangel herrscht. Um zu überleben und sich effizient in Wirtszellen zu vermehren, müssen intrazelluläre Erreger ihren Stoffwechsel auf die verfügbaren Nährstoffe und physikalischen Bedingungen anpassen [227]. Einige *in vivo* Studien zeigen, dass bei Nährstoffmangel u. a. Zucker als alternative Kohlenstoffquellen verwendet werden können [228]. Folglich ist die Fähigkeit der Bakterien, Nährstoffe aus dem Wirt zu beziehen (Transport) und die Regulation des Stoffwechsels in Reaktion auf die verfügbaren Mengen an Nährstoffen als bedeutend in der *S. Typhimurium* Virulenz zu betrachten. Mutationen, die den Transport oder den Stoffwechsel (oder beide) beeinflussen, können zu einer Beeinträchtigung der Fitness führen und zudem in einer reduzierten Virulenz resultieren [227]. Die entscheidende Bedeutung des Stoffwechsels für die bakterielle Virulenz wurde für STM bereits am aromatischen Biosyntheseweg nachgewiesen [229-234]. Dazu zählen (purin-) auxotrophe *Salmonella* Mutanten, die eine verminderte intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen und epithelialen Zellen zeigen [230, 235-237]. Die Attenuation der identifizierten *purD* Mutante (LT2 sc 3) konnte hier im U937-, RAW- sowie HeLa-Infektionsmodell nachgewiesen werden (4.2.1, 4.3). Dabei war auffällig, dass der *purD::Tn5* Stamm, welcher *in vivo* nicht überlebt [70, 238], in der U937-Infektion

DISKUSSION

scheinbar zum intrazellulären Überleben befähigt war. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine geringe antimikrobielle Aktivität nicht aktiver U937-Zellen zurückzuführen. Da murine RAW-Zellen „aktiver“ sind als humane U937-Makrophagen zeigte sich in dieser Infektion nicht nur der intrazelluläre Replikationsdefekt sondern zudem, dass die Mutante wie erwartet nicht intrazellulär überleben konnte (4.2.1, 4.2.2). Auch weitere Pathogenitätsstudien mit auxotrophen *knockout*-Mutanten unterschiedlicher Pathogene wie z. B. *Shigella* spp. und *Yersinia* spp. zeigen eine deutlich verminderte Virulenz oder sind avirulent [239, 240].

Fraglich ist warum keine weiteren Scattermutanten eine Attenuation in phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zelllinien zeigten. Möglicherweise ist der Selektionsdruck zu gering. Beispielsweise weist der Scatterklon SL1344 sc 2 mit einem defekten *allD* Gen keinen Phänotyp in den Infektionsmodellen auf, obwohl *allD* ebenso wie *purD* im Purinmetabolismus verankert ist. Die unterschiedlichen Auswirkungen könnten auf die jeweiligen Positionen zurückzuführen sein, an denen die Produkte von jedem Gen in der Purinbiosynthese agieren [241]. Untersuchungen in Minimalmedium an Stelle von LB-Flüßigmedium könnten die Identifizierung von auxotrophen Mutanten verbessern.

Ein weiteres identifiziertes Virulenzgen war *lpfE*, betroffen im Scatterklon LT2 sc 12. Im Zellkulturmodell sind die *lpf*-Fimbrien von *S. Typhimurium* nur bei der Adhäsion an Hep-2 Zellen eingebunden, nicht jedoch in der Adhäsion an Henle-, MDCK-, oder HeLa-Zellen [242], weshalb der Klon keinen Phänotyp in den hier getesteten Infektionsmodellen zeigte.

Die Identifizierung der Tn5- Mutanten im agarbasierten Screen erfolgte über die Bildung des Scatterphänotyps einiger Salmonellen Kolonien (4.1.3). Dieser Phänotyp bildete sich erst nach Inkubation bei Raumtemperatur (RT) aus und auch das Dezimieren der Kolonien durch die Amöben erfolgte erst nach mehreren Tagen bei RT (4.1.2), was wie folgt zu begründen wäre. Bei der 37°C Inkubation über Nacht haben die mesophilen Bakterien einen klaren Vorteil [211, 212], die Salmonellen können sich in ihrem Temperaturoptimum rasch vermehren und wachsen auf der LB-Agarplatte zu deutlichen Kolonien heran. Zwar sind Salmonellen nach dem Transfer der Agarplatte auf RT immer noch in der Lage zu wachsen, jedoch vermehren sie sich langsamer bei geringerer Temperatur. Hingegen befinden sich die Amöben bei 24°C im Temperaturoptimum [243] und sind nun in der Lage in die Bakterienkolonien zu wandern, sofern sie nicht bereits „überwachsen“ wurden, und sich in ihnen zu vermehren. Die Salmonellen dienen den Amöben letztlich als Nahrungsquelle, da sich das „Kräfteverhältnis“ von den Bakterien immer mehr zu den Amöben verschiebt, je länger die Inkubation bei RT andauert.

DISKUSSION

Die agarbasierten Untersuchungen zeigten zum einen, dass die Interaktion von Salmonellen mit Amöben auf Wechselwirkungen beruht, die von verschiedenen Faktoren wie Temperatur und Amöben-Bakterien-Verhältnis abhängig war und zum anderen, dass sich die *Salmonella* Scatterkoloniemorphologie deutlich von dem für Legionellen beschriebenen Scatterphänotyp unterschied (4.1.2) [152]. Zudem trat der Phänotyp bei Tn5-mutierten Salmonellen, aber auch z. T. zeitlich verzögert und in geringerer Quantität bei den Wildtypen auf. Anfangs wurde vermutet, dass mögliche spontan auftretende Mutationen der WT-Stämme einen Verlust der Widerstandsfähigkeit gegenüber den Amöben zu Folge hatten und somit die Bildung der „strahlenförmigen“ Scatterkoloniemorphologie erklärt.

Erst nach bereits fortgeschrittener Arbeit mit den Scattermutanten und den Schwierigkeiten eine Amöbeninfektion zu etablieren wurde die Diskrepanz zwischen dem *Salmonella* Scatterphänotyp und der Virulenzassoziation deutlich. In Folge dessen wurden Wildtypen weiterer *Salmonella* Serovare und Subspezies auf die Bildung des Amöben-assoziierten Scatterphänotyps getestet. Alle Wildtypstämme bildeten in der Interaktion mit *A. castellanii* ATCC, jedoch nicht mit dem *A. castellanii* NEFF Stamm, den Scatterphänotyp aus (4.3.2). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die bevorzugte Interaktion des Serovars Typhimurium mit dem *A. castellanii* ATCC Stamm gegenüber dem NEFF Stamm sein. Die differentielle Erkennung durch die Amöben könnte auf verschiedene Lektin-ähnliche Rezeptoren zurückzuführen sein, was die Effizienz der Aufnahme über die O-Antigenpolysaccharide des Serovars beeinflusst [17]. Zudem kann die Umwelt, in der sich die Amöben an unterschiedliche Bedingungen angepasst haben, eine entscheidende Rolle in der Serovarpräferenz spielen [50].

Interessanterweise waren aber auch die Amöben des *A. castellanii* NEFF Stammes in der Lage Salmonellen zu verwerten und die Bakterienkolonien zu dezimieren, wie im Plaqueassay nachgewiesen wurde (4.3.2). Eine weitere mögliche Erklärung für das Ausbleiben des Scatterphänotyps in Interaktion mit dem *A. castellanii* NEFF Stamm könnte daher die Motilität der Amöben auf den Agarplatten liefern. Die Amöben des *A. castellanii* NEFF Stammes gelten als adhärenter als die *A. castellanii* ATCC Amöben, die sehr motil sind. Der Scatterphänotyp könnte daher ausschließlich auf die Amöbenbewegung auf der Agarplatte zurückzuführen sein. Die mobileren Amöben bewegen sich in den Bakterienkolonien, sie wandern in diese ein und treten auch wieder heraus. Bei dem Austritt der Amöben aus der Bakterienkolonie „schleppt“ der Einzeller Bakterien aus der Kolonie mit sich, welche wiederum auf nährstoffreichen LB-Agarplatten kleine Mikrokolonien bilden können. Somit ergibt sich der „strahlenförmige“ Scatterphänotyp. Eine weitere Möglichkeit

DISKUSSION

wäre, dass die Salmonellen während des „Abgrasens“ einer Bakterienkolonie durch die Amöben aufgenommen werden, intrazellulär überleben und an anderer Stelle mit einem „fäkalen“ Pellet ausgeschieden werden. An dieser Stelle können sich dann neue Kolonien auf LB- Agarplatten bilden [18]. Dann wäre der Scatterphänotyp jedoch als Marker für die Widerstandsfähigkeit und dem intraamöbialen Überleben der Bakterien zu betrachten und nicht für den Verlust der bakteriellen Resistenz gegenüber Amöben.

Während der Untersuchung der *Salmonella* Wildtypstämme wurde zudem beobachtet, dass sich die „strahlenförmige“ Koloniemorphologie nur auf LB-, nicht auf *non-nutrient-agar*-Platten (NNA) ausbildet. Möglicherweise können, wegen des knappen Nahrungsangebotes, keine neuen Mikrokolonien auf NNA-Platten wachsen.

Interessanterweise ist der Scatterphänotyp partiell reproduzierbar. Wenn man nur einen Scatterklon mit Amöben koinkubiert, bildet sich wieder der Phänotyp aus. Entgegen den Erwartungen scattern aber nie alle Kolonien eines Scatterklones, die sich auf einer Agarplatte befinden. Eine mögliche Erklärung könnte der „Trittbretteffekt“ sein, bei dem die Kolonien bzw. Bakterien, die bereits mit Amöben befallen sind, aus unbekannten Gründen eine erhöhte Anziehungskraft für nachfolgende Amöben haben [213]. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass erst mit steigender Amöbenanzahl auf der LB-Agarplatte (Vermehrung in den Kolonien), die Zahl der befallenen Kolonien zunimmt. Dieses lässt vermuten, dass der Phänotyp ganz willkürlich auftritt und eher ein Indikator für die Dissemination von Salmonellen durch die Amöben ist. Der in dieser Arbeit beschriebene Scatterphänotyp von Salmonellen in der Interaktion mit *A. castellanii* ATCC wäre somit hauptsächlich ein Phänomen, welches mit der Amöbenbewegung zu erklären ist.

5.1.1.1 Das Amöbeninfektionsmodell

Freilebende Amöben repräsentieren ein potentiell Reservoir für *Salmonella enterica* [19]. Bereits mehrere Studien konnten eine funktionelle Infektion von Amöben mit Salmonellen beschreiben [17-19]. Dabei wurde für *S. Typhimurium* und *S. Dublin* die Fähigkeit zum Überleben in *A. polyphaga* und *A. castellanii* gezeigt [17, 18]. Durch den Einsatz von T3SS Mutanten und die Analyse der Transkription von ausgewählten T3SS Genen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die SPI-2 während der *S. Typhimurium* Infektion von *A. polyphaga* stark induziert und essentiell für das Überleben in Amöben ist [19].

DISKUSSION

Die Schwierigkeit bei der Etablierung eines zuverlässigen Amöbenmodells liegt in der Abhängigkeit von unterschiedlichsten Faktoren. Ein wichtiger Einflussfaktor ist die Wahl eines geeigneten Stammes bzw. Serovars. In der Studie von Tezcan-Merdol *et al* (2004) wurde eine bevorzugte Aufnahme des *Salmonella* Serovar Dublin gegenüber den Serovaren Enteritidis und Typhimurium in fünf verschiedenen *Acanthamoeba* Isolaten (*A. castellanii*, *A. rhysodes*, *A. sp.* strain AC896, I4 und V38) beobachtet [17]. Die Ernährungspräferenz ist in verwandten Amöben sehr unterschiedlich, wenn sie aus verschiedenen Umgebungen stammen. Die Amöben können sich an veränderte Umweltbedingungen angepasst haben, was Einfluss auf deren Nahrungs- bzw. Serovarpräferenz hat [50]. Daher wurden für die Etablierung außer *A. castellanii* ATCC auch weitere Amöbenstämme, wie *Hartmannella vermiformis*, *A. polyphaga*, *A. castellanii* NEFF getestet (4.3). Jedoch wurde keine verstärkte Interaktion der Salmonellen mit den weiteren Amöbenstämmen erzielt, was vermuten lässt, dass diese Amöben keine erhöhte Affinität gegenüber STM besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher vorrangig der *A. castellanii* ATCC Stamm und *S. Typhimurium* verwendet, da Studien anderer Arbeitsgruppen und die Ergebnisse des agarbasierten Screens auf Suszeptibilität gegenüber Amöben eine erfolgreiche Infektion vermuten ließen [17]. Auch die bakteriellen Wachstumsbedingungen haben erhebliche Auswirkungen auf die Effizienz der bakteriellen Aufnahme durch Amöben. In LB-Flüssigmedium kultivierte Bakterien werden effizienter von *A. rhysodes* aufgenommen als solche die auf LB-Agar kultiviert wurden [17]. Es ist möglich, dass diese signifikanten Unterschiede in der Aufnahme in Zusammenhang mit verschiedenen Mechanismen stehen. Die Infektionseffizienz von Salmonellen in Säugetier-Wirtszellen, insbesondere Epithelzellen des Darms, hängt von SPI-1 kodierten Virulenzfaktoren ab, die unter LB-Wachstumsbedingungen induziert werden [244, 245]. Die Anzucht der Salmonellen für die Amöbeninfektion erfolgte daher im Roler Drum für 3,5 h. Die Bakterien befinden sich hierbei in der späten logarithmischen Wachstumsphase, in der das SPI-1 T3SS sowie die SPI-1 Effektoren am Stärksten exprimiert werden [246], was zusätzlich zur Amöbenprädation eine aktive Infektion seitens der Salmonellen fördern sollte. Zudem wurden für die Etablierung eines Amöbenmodells weitere verschiedene Versuchsparameter für eine verbesserte Effizienz der Infektion untersucht (Tabelle 4.5), darunter zählten verschiedene Temperaturen, da die optimale Wachstumstemperatur für *Acanthamoeba* zwischen 25 - 30°C [243] und für *Salmonella* zwischen 35 - 37°C liegt [212], sich beide Organismen aber an extreme Umweltbedingungen, einschließlich Temperaturen im Bereich von 4°C bis 45°C anpassen können. Des Weiteren wurden unterschiedliche Infektionsmedien, MOI's, Infektionszeiten

DISKUSSION

uvm. (4.3) getestet, wobei sich an veröffentlichten Studien orientiert wurde, die eine erfolgreiche Auswertung eines *Gentamicin protection assays* über *cfu*-Bestimmung beschreiben [17, 19]. Da eine Behandlung mit Gentamicin zum Abtöten extrazellulärer Bakterien für die Bestimmung intrazellulärer Bakterien erforderlich war, wurde die Antibiotikawirkung auf die Salmonellen getestet. In unserem Versuch wirkte Gentamicin bereits ab einer Konzentration von 25µg/ ml im Medium bakterizid (Daten nicht gezeigt), sollte jedoch bei 10µg/ ml Medium bakteriostatisch sein [159]. Zudem wurde gezeigt, dass Gentamicin (100µg/ ml) in Kurzzeitversuchen mit Makrophagen (bis 6h) die intrazelluläre Vermehrung von Salmonellen nicht beeinflusst [247]. Auch auf das Wachstum von *A. castellanii* hat die Zugabe von Gentamicin keine signifikanten Effekte [248]. Doch entgegen den Erwartungen konnte der Nachweis einer Aufnahme und intrazellulären Überlebens von *S. Typhimurium* in *A. castellanii* in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, da sich nach Infektion keine Kolonien auf Agarplatten bildeten.

Möglicherweise könnte das Antibiotikum über Pinozytose von den Amöben aufgenommen werden und putative intrazelluläre Erreger schädigen und/ oder abtöten. Dieser Effekt wäre ebenso zu beobachten, wenn die Amöbe durch die rasche intrazelluläre Vermehrung der Bakterien absterben würde. Während der Infektion waren neben Amöben-assoziierten Bakterien auch frei im Medium befindliche Salmonellen zu beobachten (4.3, Abb. 4.11). Denkbar wäre daher zum einen eine Ausscheidung der intrazellulären Bakterien aus den Amöben in das umgebende Medium [18] und zum anderen, dass die Salmonellen nach der Adhäsion lediglich durch die Amöben passagieren. In beiden Fällen würden die Bakterien nicht mehr als intrazelluläre Keime erfasst werden können und vom Antibiotikum abgetötet. Das könnte ein Grund für das Ausbleiben der Bildung von *colony forming units* sein. Ein weiterer Grund könnte die *rpoS* Mutation der untersuchten *Salmonella* Stämme sein. Die Mutation des STM LT2 Stammes im Startcodon bewirkt Sensitivität gegenüber Umweltstress und die Unfähigkeit eine langanhaltende Säuretoleranz zu bilden [173, 174]. Zusätzlich reguliert RpoS aber auch die Expression der Plasmid-kodierten *spv* Gene in *Salmonella*, die für die Virulenz in Mäusen erforderlich sind, womit die Mutation zudem eine Avirulenz im Mausinfektionsmodell bedingt [173]. Zwar beeinflusste die Mutation nicht die Interpretation der Makrophagen- und Epithelzellinfektionen (4.3.1.2), für das Amöbenmodell könnte sie jedoch eine entscheidende Rolle in der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit spielen. Dabei könnten sich *Salmonella rpoS* Mutanten ähnlich wie solche von *Legionella* verhalten, die zur Replikation in Makrophagen befähigt sind, nicht aber in *A. castellanii* überleben können [172].

DISKUSSION

Letztendlich konnte das Amöbenmodell dahingehend optimiert werden, dass mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen eine Interaktion bzw. direkte Assoziation der Salmonellen mit den Amöben beobachtet werden konnte, wie auch der Amöbenscreen auf Suszeptibilität vermuten ließ. Obwohl uninfizierte Amöben und Zysten ein gewisses Maß an Autofluoreszenz besaßen (Daten nicht gezeigt), waren adhärente Bakterien während der Infektion rund um Trophozoiten deutlich sichtbar (4.3, Abb. 4.11). Das Hauptproblem beim Nachweis einer effizienten *S. Typhimurium* Infektion von *A. castellanii* war jedoch zwischen Adhäsion und/ oder Invasion der Erreger zu differenzieren. Möglicherweise würden elektronenmikroskopische Analysen Aufschluss über einen intrazellulären Status der Bakterien in *A. castellanii* geben.

Da die Etablierung eines effektiven quantitativen Amöbeninfektionsmodells in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich war, sind zukünftig weitere Testungen erforderlich. Dabei sollte in erster Hinsicht ein Salmonellen Stamm mit einem unmutierten *rpoS* Gen eingesetzt werden. Zudem sollten Amöben-Salmonellen-Paarungen verwendet werden, die eine hohe Affinität zueinander aufweisen und eine erfolgreiche Infektion vermuten lassen [17]. Auch die Wahl der Inkubationstemperatur ist entscheidend für eine effiziente Aufnahme der Bakterien. Wie für Shigellen gezeigt, ist eine erhöhte Aufnahme durch *Acanthamoeba* bei 18°C gegenüber 25°C und 37°C beobachtet worden [249]. *Shigella* Virulenzgene werden, wie bei Salmonellen bei 37°C aktiviert und daher wird angenommen, dass diese zum Absterben der Amöben beitragen. Die Umweltumgebungstemperatur der Amöbenisolate trägt entscheidend zur Aufnahmerate der Bakterien bei und sollte demzufolge eher 24°C und niedriger betragen. Auch eignen sich für Infektionsversuche eher nährstoffarme Medien, weil diese den Umweltbedingungen am Nächsten kommen [249].

Bis dato ist nur wenig über die Interaktion von Salmonellen mit Amöben bekannt, daher ist es wünschenswert weitere Analysen in Betracht zu ziehen, um die Wechselwirkung dieser Organismen näher zu untersuchen. Amöben stellen für Salmonellen, anders als für Legionellen, keinen bevorzugten Wirt dar, sondern sind vielmehr als Reservoir in der Umwelt zu sehen bzw. als zwei Organismen die im gleichen Habitat vorkommen und möglicherweise wechselwirken. Wie für *S. Typhi* gezeigt, erhöht sich die Persistenz des Bakteriums bereits in Anwesenheit von *A. castellanii* [248]. Daher wäre zunächst zu klären, ob ein direkter Zell-Zell-Kontakt für eventuelle Einflüsse auf die Überlebensrate von *S. Typhimurium* notwendig ist oder ob von Amöben sezernierte lösliche Stoffe von den Bakterien vorteilhaft verwertet

DISKUSSION

werden können. Denkbar wäre hier Transwell-Assays einzusetzen, um den gegenseitigen Einfluss der Organismen zu untersuchen.

Mehrere Studien berichten von einer intrazellulären Vermehrung von Bakterien in Protozoen, wie u. a. in *Acanthamoeba* [19, 21, 37, 44, 250, 251]. In vielen Fällen ist es jedoch schwierig zwischen saprophytischem Wachstum von Bakterien in Kokultur mit Protozoen und einer tatsächlichen bakteriellen intrazellulären Replikation zu unterscheiden. Für mikroskopische Auswertungen einer intrazellulären Vermehrung könnte man daher ein *fis:gfp* Konstrukt verwenden, welches als Wachstumsindikator genutzt wird, da die Expression von der Wachstumsrate abhängig ist [252]. FIS (*factor for inverse stimulation*) ist ein Nukleoid-assoziiertes Protein in *E. coli*, welches die Rekombination, Replikation und Transkriptionsreaktionen reguliert. Aufgrund des Zusammenhangs von Wachstumsrate, Genexpression und Fluoreszenzsignal könnte die Verwendung eines *fis:gfp* Konstruktes so zur Identifizierung von Amöben mit sich replizierenden Salmonellen beitragen.

Nach Bleasdale *et al* (2009) ist das SPI-2 kodierte T3SS und die SPI-2 sekretierten Effektoren wesentlich am Überleben von *S. Typhimurium* in freilebenden Amöben beteiligt [19]. Daher wäre ein weiteres Fusionskonstrukt denkbar, um intrazelluläre Salmonellen in Amöben nachzuweisen, wie z. B. *PssaG::gfp*. GFP wird hier unter den SPI-2 Promoter exprimiert. Dieser GFP-Reporter wird nicht durch extrazelluläre Bakterien induziert, aber stark exprimiert, wenn sich der Erreger intrazellulär (innerhalb SCV) befindet [253].

Letztendlich konnte nicht geklärt werden, ob die im Amöbenscreen identifizierten Gene für die Salmonellen-Amöben-Interaktion von Bedeutung sind, da es nicht gelungen ist ein effektives quantitatives Amöbeninfektionsmodell zu etablieren in dem die Scatterklone hätten getestet werden können. Zudem stellte sich der Salmonellen-Amöbenscreen als nicht aussagekräftig heraus, da der *Salmonella* Scatterphänotyp kein generell auftretendes Phänomen in der Interaktion von Amöben mit Salmonellen auf Agarplatten war und das Ausbleiben des Phänotyps keine Widerstandsfähigkeit gegenüber Amöben bedeutete. Schlussendlich resultiert das unter den gewählten Bedingungen der Screen auf Salmonellen mit Suszeptibilität gegenüber Amöben keine virulenzdefekten Mutanten anzeigt.

Die Interaktion von Salmonellen mit Amöben ist jedoch ein spannendes Thema was immer mehr wissenschaftliches Interesse findet und Aufschlüsse über Überlebensstrategien pathogener Bakterien gegenüber widrigen Bedingungen und/ oder Prädation durch Protozoen in der Umwelt liefert und daher weiter detailliert untersucht werden sollte.

5.1.2 Charakterisierung von Patatin-ähnlichen Proteinen bei *Salmonella* Typhimurium

5.1.2.1 *Salmonella* Typhimurium besitzt zwei Patatin-ähnliche Proteine

In dieser Arbeit wurden erstmalig STM PLP untersucht und geprüft, ob sie eine Bedeutung in der bakteriellen Virulenz haben, da in mehreren Studien mit anderen gramnegativen Bakterien, wie *Legionella* und *Pseudomonas* Patatin-ähnliche Proteine als Virulenzfaktoren beschrieben wurden [131, 152].

Sequenzvergleichsanalysen mit bekannten PLP aus verschiedenen bakteriellen Genomen zeigen die weite Verbreitung dieser neuen Familie von lipolytischen Enzymen in einer Vielzahl gramnegativer und -positiver Bakterien, aber auch Eukaryoten. Diese Studie liefert bereits den Nachweis, dass STM LT2 ein Patatin-ähnliches Protein mit einer Patatindomäne besitzt, welches als hypothetisches Protein YchK annotiert ist [113]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein weiteres PLP in STM LT2, SL1344 und 14028 gefunden und beschrieben, dass als putative Phosphoesterase annotierte YjjU. Beide STM Proteine zeichneten sich durch das Vorhandensein von charakteristischen Aminosäuren in vier konservierten Blöcken aus (4.4.1).

Ein interessanter Aspekt ist das vermehrte Auftreten der PLP Gene bei Pathogenen und Symbionten im Vergleich zu einer signifikant reduzierten Anzahl bei apathogenen Stämmen. Beispielsweise enthält das Genom des pathogenen *E. coli* O157:H7 vier PLP Gene, das Genom des nicht-pathogenen *E. coli* K-12 Stammes jedoch nur zwei. Außerdem kann die Anzahl der PLP Gene zwischen verschiedenen Spezies eines Genus` variieren. Beispielsweise trägt *Mycobacterium leprae* im Genom nur ein PLP Gen, während das Genom von *M. tuberculosis* acht entsprechende Gene aufweist [113].

In STM wurden zwei PLP Gene identifiziert. Homologe Gene wurden in evolutionär verwandten pathogenen Stämmen, wie *Shigella flexneri* nachgewiesen (4.4.1). Diese und weitere *in silico* Ergebnisse wie die Ermittlung des GC-Gehalts der Gene verdeutlichen (4.4.2), dass diese zwei STM PLP Gene zu keinem additiv erworbenen Gencluster einer Pathogenitätsinsel gehören, sondern als Teil des Kerngenomes chromosomal und gemeinsam in enteritischen Spezies vorliegen [254]. Diese Kerngenomgene können funktionell mit dem gemeinsam genutzten Lebensstil der intestinalen Besiedelung und dem Überleben in der Umwelt assoziiert sein [255], was mit einer Anpassung der Pathogene an den Wirt und Umgebung einhergeht.

DISKUSSION

Weitere Genomsequenzvergleiche innerhalb des Genus zeigten, dass neben *S. enterica* auch in der zweiten *Salmonella* Spezies, *S. bongori* zwei zu PLP YchK und YjjU homologe Proteine zu finden waren. Die zwei Spezies unterscheiden sich hinsichtlich der Aufnahme einer zweiten Pathogenitätsinsel (SPI-2) von *S. enterica* [81]. Innerhalb der Spezies *S. enterica* sind YchK und YjjU homologe Proteine neben der Subspezies I nur noch in der Subspezies IIIa vertreten. In den weiteren bisher sequenzierten Stämmen der *S. enterica* Subspezies II, IIIb, V und VI waren über BLAST-Analysen keine PLP homologen Proteine zu finden (4.4.1). Eine mögliche Erklärung für die Variation im Vorhandensein der PLP Gene innerhalb des Genus` könnte die phylogenetische Entwicklung der Spezies und Subspezies liefern. *S. enterica* und *S. bongori* divergierten vor ca. 25 Mio. Jahren und bilden die zwei *Salmonella* Spezies. Die Subspezies IIIa war die früheste divergierende Linie von der *S. enterica* Spezies, erst danach unterschieden sich die weiteren Subspezies, wobei die Subspezies I (*enterica*) zuletzt divergierte [81, 256]. Die Erreger dieser Subspezies haben jedoch ein umfassendes Wirtsspektrum und infizieren meist Warmblüter, womit die Konservierung der PLP erklärt werden könnte, da diese Gene womöglich eine entscheidende Rolle in der Virulenz der Erreger spielen. In Folge der Evolution des Genus und der Wirtsadaptation der Subspezies II, IIIb, V und VI, die ausschließlich Erstinfektionen bei Kaltblütern hervorrufen, könnten die PLP Gene reduziert worden sein. Bemerkenswert ist, dass der humanpathogene *S. enterica* Typhi Stamm, welcher durch den genetischen Abbau ein auf den Menschen begrenztes Wirtsspektrum aufweist [257], ebenfalls zwei zu YchK und YjjU homologe PLP Gene besitzt. Wie im Genom von *M. leprae* zeigt sich ein Prozess der „reduktiven Evolution“, welcher zu einer minimalen Genzahl führt, die aber ausreichend für das Überleben in einer hochspezialisierten Nische ist [258], was wiederum eine Korrelation zwischen den PLP Genen und der Virulenz eines Organismus` erkennen lässt. Die PLP Gene könnten für das Bakterium einen Vorteil in der Interaktion mit dem Wirt, die Anpassung an unterschiedliche Umgebungen und den Wettbewerb mit anderen Mikroorganismen verleihen [113].

5.1.2.2 Lipolytische Aktivität der Patatin-ähnlichen Proteine

Im Vorfeld dieser Arbeit existierten nach unseren Kenntnissen keine experimentell fundierten Daten bezüglich der biochemischen Aktivität und Funktion der *Salmonella* PLP, YchK und YjjU.

DISKUSSION

Die Untersuchung der lipolytischen Aktivität der PLP in *Salmonella* lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse, da die Messung der freien Fettsäuren im Lipidhydrolyseassay großen Abweichungen unterlag und keine Tendenz erkennen ließ (4.7). Die im Assay aufgetretenen Schwankungen sind durch die ermittelte, generell sehr geringe Aktivität (unterste Erfassungsgrenze), sowohl in den PLP *knockout*-Mutanten Stämmen wie auch im WT-Stamm, zu erklären. Möglicherweise kann durch Zugabe von (eukaryotischen) Kofaktoren die enzymatische Aktivität in *Salmonella* verändert oder aktiviert werden.

Letztlich konnte wegen der methodischen Problematik bzw. der geringen enzymatischen Aktivität das Fehlen der PLP Gene in den lipolytischen Eigenschaften der *Salmonella-knockout*-Mutanten daher nicht nachvollzogen werden.

Des Weiteren wurden, zur Untersuchung der putativen lipolytischen Aktivität, die zwei *S. Typhimurium* PLP Gene (*yckK*, *yjjU*) in *E. coli* exprimiert. Sowohl YchK-V5/ 6×His wie auch YjjU-V5/ 6×His wurden gereinigt und auf enzymatische Aktivität getestet. Im Ergebnis dieser Studie zeigte sich, dass sowohl YchK-V5/ 6×His wie auch YjjU-V5/ 6×His Phospholipase A Aktivität besitzen (4.9.2). Beide rekombinanten Proteine wiesen eine Substratspezifität gegenüber dem Diazyl-Phospholipid DPPG auf. Sie waren aber auch in der Lage DPPC und Lysophospholipide (LPLA) wie MPLPG und MPLPC zu deazylieren. Es ist bekannt das Phospholipasen A auch Lysophospholipase A-Aktivität besitzen. Für das *P. aeruginosa* ExoU beispielsweise wurde nachgewiesen, dass es nicht nur die *sn2*-Fettsäuren der Phospholipide abspaltet, sondern anschließend die zweite Fettsäure entfernt und somit als Lysophospholipasen A fungiert [259, 260].

Für die lipolytischen Aktivitäten von YchK und YjjU waren die katalytisch aktiven Serinreste (S41 und S61) im aktiven Zentrum mit G-X-S-X-G Motiv essentiell, was die Experimente mit Proteinen belegen, welche im Lipasemotiv mutiert waren (4.9.2). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Phospholipase Aktivität eindeutig der Patatindomäne zu zuordnen ist. In YjjU^{S61A}-V5/ 6×His-tag hatte die Mutation den vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität zur Folge. Interessanterweise zeigte, dass rekombinant exprimierte und gereinigte YchK^{S41A}-V5/ 6×His-tag lediglich eine signifikante Reduktion der lipolytischen Aktivität. Ersten Vermutungen zu Folge könnte der Aktivitätsverlust, durch das Fehlen des katalytischen Serins im G-X-S-X-G- Motiv, von dem benachbarten Serin (S44) gepuffert bzw. ausgeglichen werden. Dieses Serin könnte anstelle des S41 mit dem Aspartat interagieren, eine alternative katalytische Diade bilden und somit eine vollständige Aktivitätsinaktivierung verhindert werden. In RssA, ein YchK homologes Protein in *E. coli*, befindet sich ebenfalls an Position 44 ein weiteres Serin in direkter Nachbarschaft zu dem

DISKUSSION

Lipasemotiv. Untersuchungen im Lipidhydrolysetest mit einer RssA^{S41A} Mutante zeigen jedoch einen vollständigen Verlust der PLA Aktivität [191]. Auffällig ist zudem, dass die Ergebnisse für RssA fast ausschließlich PLA Aktivität an DPPG nachweisen. Für YchK-V5/6×His konnte neben der Spezifität zu DPPG ebenfalls enzymatische Aktivität an DPPC und den Lysophospholipiden MPLPG und MPLPC gezeigt werden (4.9.2). Ein breites Spektrum an Substraten ist für Phospholipasen A nicht selten. Auch Patatin und ExoU nutzen verschiedene Substrate, zu denen mehrere Phospholipide und neutrale Lipide zählen [116, 130, 131].

Wie in Kapitel 4.9.1 erwähnt war nach der affinitätschromatographischen Reinigung der STM PLP immer noch viel Fremdprotein in der Probe. Diese *E. coli* Fremdproteine könnten die Ergebnisse der Lipidhydrolyse verfälschen, da sie selbst eine enzymatische Aktivität besitzen können. Vor allem die Untersuchung der lipolytischen Aktivität in *E. coli* zeigten (4.9), dass in dem Zelllysats des Expressionsstammes viel Hintergrundaktivität zu verzeichnen war und für YchK-V5/6×His sogar lipolytische Aktivität gegenüber MPLPG beobachtet wurde. Die tatsächliche PLA Aktivität, wie mit gereinigtem YchK-V5/6×His, könnte in der Untersuchung in den *E. coli* Expressionsklonen durch z.B. Azyltransferaseaktivität überdeckt bzw. blockiert worden sein oder auf Grund einer geringen PLP Proteinmenge nicht erkannt werden.

5.1.2.2.1 Die Rolle der Patatin-ähnlichen Proteine bei *Salmonella*

Wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt besitzen gereinigtes rekombinantes YjjU-V5/6×His und YchK-V5/6×His Phospholipase A Aktivität mit Spezifität zu DPPG, was Fragen über die physiologische Funktion der PLP aufwirft.

Das anionische Phospholipid Phosphatidylglycerol (PG) ist in nahezu allen bakteriellen Membranen zu finden. Die Kopfgruppe von PG ist in der Assoziation von vielen zytoplasmatischen Proteinen an der Membran involviert [261]. Durch Veränderungen der Lipidzusammensetzung, beispielsweise infolge der YjjU- und YchK-vermittelten Phospholipase A Aktivität, die eine Kopfgruppe oder eine Fettsäure der Lipide abtrennt, könnte diese Assoziation zytoplasmatischer Proteine an die Membran beeinflusst werden. Zudem könnten die physikalischen Eigenschaften einer Membran beeinflusst werden, wenn sich die Lipidzusammensetzung, bedingt durch Phospholipasen, ändert. Des Weiteren spielen Phospholipide in vielen zellulären Prozessen eine Rolle, u. a. bei der Initiation der DNA-

DISKUSSION

Replikation [262-265], sie wirken auf viele Enzyme, die DNA oder Nukleotide binden [266-268] und sind an der Translokation von Proteinen über die Membran beteiligt [269].

Der Abbau dieser Phospholipide durch Phospholipasen könnte die Wirtsmembranen schädigen und in einer Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen resultieren. Daher ist es möglich, dass die PLP im Infektionsverhalten des Bakteriums eine Rolle spielen und für die vollständige Virulenz benötigt werden. Wie Experimente mit generierten PLP Einzel-*knockout*-Mutanten und einer PLP Doppel-*knockout*-Mutante zeigten, sind die PLP für Infektionen von humanen Makrophagen und HeLa-Epithelzellen jedoch nicht essentiell (4.11). Untersuchungen von Chaudhuri *et al* (2009) zu Folge, könnte das YchK jedoch im Mausmodell an der Virulenz des Bakteriums beteiligt sein [196]. In der Studie konnten mittels eines quantitativen Screens Transposonmutanten identifiziert werden, die im Mausmodell attenuiert waren. Hierbei wurde *ychK* als ein Gen identifiziert, welches für die Infektion von Mäusen durch *Salmonella* Typhimurium notwendig sein könnte [196]. Im Mausmodell wurde bereits für ExoU gezeigt, dass die Expression dieser Phospholipase in *P. aeruginosa* Stämmen zu keiner Virulenz im Mausmodell führt [132], sondern Letalität verursacht [133]. Des Weiteren zeigen Gruppe A *Streptococcus* mit einem mutierten SlaA, eine sekretierte Phospholipase A, ebenso eine reduzierte Virulenz im Mausmodell [270, 271]. Sollten YjjU und YchK sekretiert werden, könnten sie möglicherweise beim Eintritt in Mauszellen im Zusammenspiel mit Wirtszellfaktoren wirken. Eine Untersuchung mit den generierten PLP Einzel-*knockout* Mutanten und einer PLP Doppel-*knockout* Mutante im Mausinfektionsmodell könnte Aufschluss über die Auswirkungen auf die Virulenz geben. Vorab könnte beispielsweise mittels Real Time-PCR Analysen die natürliche Regulation der beiden Gene untersucht werden und wann sie im Infektionsgeschehen exprimiert werden.

Nach dem Wirtszellkontakt, können Bakterien über Sekretionssysteme Proteine direkt in die Wirtszelle translozieren, wo sie die wirtszelleigene (Immun-) Abwehr und Signalsysteme untergraben [272]. Beispielsweise wird ExoU über ein T3SS direkt in das Zytosol eukaryotischer Zellen sekretiert [133, 137, 273]. In zwei unabhängigen Studien wurde gezeigt, dass das *L. pneumophila* PLP VipD/ PatA ein Typ IVB Dot/ Icm sekretiertes Effektorprotein ist [193, 274]. Das Dot/ Icm System transloziert Proteine in eukaryotische Wirte in vergleichbarer Weise wie das bakterielle Typ-III-Sekretionssystem [275, 276]. Für den Transport mittels eines Sekretionssystems sind N- oder C-terminale Regionen der Proteine erforderlich. Die *in silico* Analysen der STM PLP ließen jedoch kein Sec-abhängiges Signalpeptid für beide Proteine erkennen (4.4.2). Erste Sekretionsexperimente mit

DISKUSSION

überexprimierten YjjU und YchK in STM zeigten keine Sekretion der Proteine in dem 10-fach konzentrierten Kulturüberstand (4.10). Möglicherweise aber liefert die Konzentrierung des Kulturüberstandes nicht genug Protein zum Nachweis mittels Western Blot. Daher wäre eine Fällung der Proteine aus dem Überstand denkbar, um eine mögliche Sekretion von YjjU und YchK präzise zu untersuchen. Den überexprimierten PLP sind am C-Terminus ein V5-Epitop sowie ein 6×His-tag angehängt, welche die Sekretion z. B. über T3SS jedoch nicht behindern sollten (4.8). Zu sezernierende Proteine werden hierbei vom Nadelkomplex des Typ-III-Sekretionssystem über ein Sekretionssignal erkannt, welches normalerweise eine kurze Aminosäuresequenz am N-Terminus des Proteins darstellt. Zudem besteht der V5-tag lediglich aus 15 und der His-tag aus 6 Aminosäuren, womit keine sterischen Auswirkungen auf das Protein vermutet werden.

Eine generelle Sekretion der STM PLP kann nicht ausgeschlossen werden, da auch eine C-terminale Signalsequenz zur Sekretion denkbar wäre, die durch die Tags blockiert bzw. beeinflusst werden könnte. Beispielsweise ist für eine Sekretion über das SPI-4 kodierte Typ-I-Sekretionssystem von *Salmonella* die Funktion des C-Terminus als Signalsequenz für die Erkennung beobachtet worden [277]. Auch die Sekretion einer extrazellulären Metalloprotease B von *Erwinia chrysanthemi* verläuft ohne ein N-terminales Signalpeptid. Das Sekretionssignal liegt hierbei in den letzten 40 C-terminalen Aminosäuren des Proteins. Das α -Hämolyisin von *E. coli* weist ebenso ein C-terminales Sekretionssignal auf und wird über ein Typ-I-Sekretionssystem transloziert [278]. Um ein C-terminales Sekretionssignal nachzuweisen wäre eine Sekretionsanalyse der PLP mit einem N-terminalen Fusionstag möglich.

Es wäre zudem denkbar, dass YjjU und YchK als intrazelluläre Phospholipasen agieren. So könnte YchK eine regulatorische Rolle übernehmen, da die Phospholipase und Hnr, der Response Regulator für RpoS, vermutlich in einem Operon kodiert werden (4.4.2). Die Genprodukte eines Operons sind oftmals an denselben zellulären Prozessen beteiligt. Ein physiologischer Zusammenhang beider Proteine könnte ähnlich wie bei dem zu YchK homologen Protein RssA von *E. coli* und dem Nachbarn RssB bestehen. RssA besitzt Phospholipase A-Aktivität und spaltet spezifisch Phosphatidylglycerin. Aus dieser Reaktion resultiert Lysophosphatidylglycerin als Spaltprodukt, welches die Autophosphorylierung der Kinase ArcB hemmt und folglich die Phosphorylierung von RssB vermindert [191]. In ähnlicher Weise könnte YchK auf die Phosphorylierung von Hnr wirken und damit die Proteolyse von RpoS indirekt beeinflussen. Es ist somit denkbar das YchK als Modulator

DISKUSSION

fungiert, der die Hnr-Aktivität steuert. Dazu könnte in künftigen Experimenten die Interaktion von YchK und Hnr untersucht werden und Aufschluss über eine direkte oder indirekte, über die Phospholipaseaktivität vermittelte Hnr-Phosphorylierung geben.

Die Aufklärung der vollen Aktivität und Rolle, welche YjjU und YchK möglicherweise in der Pathogenität und Regulation von zellulären Prozessen spielen bedarf weiterer Studien. Die Identifizierung der Phospholipase A-Aktivität der beiden *Salmonella* Patatin-ähnlichen Proteine ist jedoch der erste Schritt den Wirkmechanismus in der Biologie der Wirts-Bakterien-Interaktion zu verstehen und liefert erste Anzeichen, dass *S. Typhimurium* Patatin-ähnliche Proteine hypothetisch Virulenzgene darstellen können.

6. Literaturverzeichnis

1. Balabanova, Y., et al., *Communicable diseases prioritized for surveillance and epidemiological research: results of a standardized prioritization procedure in Germany, 2011*. PLoS One, 2011. 6(10): p. e25691.
2. Ochman, H. and A.C. Wilson, *Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes*. J Mol Evol, 1987. 26(1-2): p. 74-86.
3. Cotter, P.A. and V.J. DiRita, *Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective*. Annu Rev Microbiol, 2000. 54: p. 519-65.
4. Darwin, K.H. and V.L. Miller, *Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa*. Clin Microbiol Rev, 1999. 12(3): p. 405-28.
5. Reeves, M.W., et al., *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov.* J Clin Microbiol, 1989. 27(2): p. 313-20.
6. Popoff, M.Y., J. Bockemuhl, and L.L. Gheesling, *Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme*. Res Microbiol, 2004. 155(7): p. 568-70.
7. J., B., *Infektionskrankheiten der Haustiere*. Teil 2, 3. Auflage ed. 1982. 2.
8. S., S., *Untersuchungen zur Epidemiologie von Salmonelleninfektionen und zur Sanierung von salmonelleninfizierten Schweinezucht- und -vermehrerbetrieben.*, 1999, Vet. Med. Hannover.
9. Tschäpe, H., Bockemühl, J., *Lebensmittelübertragende Salmonellose in Deutschland*, in *Bundesgesundheitsblatt- Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz 2002* 2002.
10. Tauxe, R.V., *Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge*. Emerg Infect Dis, 1997. 3(4): p. 425-34.
11. Gandhi, M., et al., *Use of green fluorescent protein expressing Salmonella Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts*. J Food Prot, 2001. 64(12): p. 1891-8.
12. Guo, X., et al., *Survival of salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening*. Appl Environ Microbiol, 2001. 67(10): p. 4760-4.
13. Guo, X., et al., *Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution*. Appl Environ Microbiol, 2002. 68(7): p. 3639-43.
14. Teplitski, M., J.D. Barak, and K.R. Schneider, *Human enteric pathogens in produce: unanswered ecological questions with direct implications for food safety*. Curr Opin Biotechnol, 2009. 20(2): p. 166-71.
15. Rude, R.A., et al., *Survey of fresh vegetables for nematodes, amoebae, and Salmonella*. J Assoc Off Anal Chem, 1984. 67(3): p. 613-5.
16. Gourabathini, P., et al., *Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach*. Appl Environ Microbiol, 2008. 74(8): p. 2518-25.
17. Tezcan-Merdol, D., et al., *Uptake and replication of Salmonella enterica in Acanthamoeba rhysodes*. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(6): p. 3706-14.
18. Gaze, W.H., et al., *Interactions between Salmonella typhimurium and Acanthamoeba polyphaga, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles*. Microb Ecol, 2003. 46(3): p. 358-69.
19. Bleasdale, B., et al., *The Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in free-living amoebae*. Appl Environ Microbiol, 2009. 75(6): p. 1793-5.
20. Rasmussen, M.A., et al., *Exposure to rumen protozoa leads to enhancement of pathogenicity of and invasion by multiple-antibiotic-resistant Salmonella enterica bearing SGII*. Infect Immun, 2005. 73(8): p. 4668-75.
21. Cirillo, J.D., et al., *Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence*. Infect Immun, 1997. 65(9): p. 3759-67.

LITERATURVERZEICHNIS

22. McCuddin, Z.P., et al., *Klebsiella to Salmonella gene transfer within rumen protozoa: implications for antibiotic resistance and rumen defaunation*. Vet Microbiol, 2006. 114(3-4): p. 275-84.
23. Winiecka-Krusnell, J. and E. Linder, *Bacterial infections of free-living amoebae*. Res Microbiol, 2001. 152(7): p. 613-9.
24. Greub, G. and D. Raoult, *Microorganisms resistant to free-living amoebae*. Clin Microbiol Rev, 2004. 17(2): p. 413-33.
25. Molmeret, M., et al., *Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens*. Appl Environ Microbiol, 2005. 71(1): p. 20-8.
26. Zaman, V., M. Zaki, and M. Manzoor, *Acanthamoeba in human faeces from Karachi*. Ann Trop Med Parasitol, 1999. 93(2): p. 189-91.
27. Sesma, M.J. and L.Z. Ramos, *Isolation of free-living amoebas from the intestinal contents of reptiles*. J Parasitol, 1989. 75(2): p. 322-4.
28. Bozue, J.A. and W. Johnson, *Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion*. Infect Immun, 1996. 64(2): p. 668-73.
29. Santic, M., et al., *Intra-Vacuolar Proliferation of F. Novicida within H. Vermiformis*. Front Microbiol, 2011. 2: p. 78.
30. Collingro, A., et al., '*Candidatus Protochlamydia amoebophila*', an endosymbiont of *Acanthamoeba* spp. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. 55(Pt 5): p. 1863-6.
31. Horn, M. and M. Wagner, *Bacterial endosymbionts of free-living amoebae*. J Eukaryot Microbiol, 2004. 51(5): p. 509-14.
32. Drozanski, W., *Fatal bacterial infection in soil amoebae*. Acta Microbiol Pol, 1956. 5(3-4): p. 315-7.
33. Rowbotham, T.J., *Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae*. J Clin Pathol, 1980. 33(12): p. 1179-83.
34. Bottone, E.J., et al., *Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of Acanthamoeba spp.* J Med Microbiol, 1994. 40(2): p. 148-54.
35. Proca-Ciobanu, M., et al., *Electron microscopic study of a pathogenic Acanthamoeba castellanii strain: the presence of bacterial endosymbionts*. Int J Parasitol, 1975. 5(1): p. 49-56.
36. Khan, N.A., *Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health*. FEMS Microbiol Rev, 2006. 30(4): p. 564-95.
37. Barker, J., T.J. Humphrey, and M.W. Brown, *Survival of Escherichia coli O157 in a soil protozoan: implications for disease*. FEMS Microbiol Lett, 1999. 173(2): p. 291-5.
38. La Scola, B. and D. Raoult, *Survival of Coxiella burnetii within free-living amoeba Acanthamoeba castellanii*. Clin Microbiol Infect, 2001. 7(2): p. 75-9.
39. Michel, R., H. Burghardt, and H. Bergmann, *[Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with Pseudomonas aeruginosa, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital]*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1995. 196(6): p. 532-44.
40. Thom, S., D. Warhurst, and B.S. Drasar, *Association of Vibrio cholerae with fresh water amoebae*. J Med Microbiol, 1992. 36(5): p. 303-6.
41. Sandstrom, G., A. Saeed, and H. Abd, *Acanthamoeba polyphaga is a possible host for Vibrio cholerae in aquatic environments*. Exp Parasitol, 2010. 126(1): p. 65-8.
42. Winiecka-Krusnell, J., et al., *Free-living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori*. Scand J Infect Dis, 2002. 34(4): p. 253-6.
43. Kahane, S., et al., *Infection of Acanthamoeba polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis survival within amoebal cysts*. Appl Environ Microbiol, 2001. 67(10): p. 4789-95.
44. Ly, T.M. and H.E. Muller, *Ingested Listeria monocytogenes survive and multiply in protozoa*. J Med Microbiol, 1990. 33(1): p. 51-4.
45. Steinert, M., et al., *Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with Acanthamoeba polyphaga and survive within cyst walls*. Appl Environ Microbiol, 1998. 64(6): p. 2256-61.
46. King, C.H., et al., *Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination*. Appl Environ Microbiol, 1988. 54(12): p. 3023-33.

LITERATURVERZEICHNIS

47. Snelling, W.J., et al., *Bacterial-protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness*. Microbes Infect, 2006. 8(2): p. 578-87.
48. Taylor, S.J., et al., *Infection of Acanthamoeba castellanii with Mycobacterium bovis and M. bovis BCG and survival of M. bovis within the amoebae*. Appl Environ Microbiol, 2003. 69(7): p. 4316-9.
49. Holden, E.P., et al., *Intracellular growth of Legionella pneumophila within Acanthamoeba castellanii* Neff. Infect Immun, 1984. 45(1): p. 18-24.
50. Wildschutte, H. and J.G. Lawrence, *Differential Salmonella survival against communities of intestinal amoebae*. Microbiology, 2007. 153(Pt 6): p. 1781-9.
51. Akya, A., A. Pointon, and C. Thomas, *Listeria monocytogenes does not survive ingestion by Acanthamoeba polyphaga*. Microbiology, 2010. 156(Pt 3): p. 809-18.
52. Cirillo, D.M., et al., *Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival*. Mol Microbiol, 1998. 30(1): p. 175-88.
53. Ochman, H., et al., *Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(15): p. 7800-4.
54. Shea, J.E., et al., *Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(6): p. 2593-7.
55. Feng, Y., et al., *Apoptosis-like cell death induced by Salmonella in Acanthamoeba rhysodes*. Genomics, 2009. 94(2): p. 132-7.
56. Groisman, E.A., *The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ*. J Bacteriol, 2001. 183(6): p. 1835-42.
57. Prost, L.R., et al., *The PhoQ histidine kinases of Salmonella and Pseudomonas spp. are structurally and functionally different: evidence that pH and antimicrobial peptide sensing contribute to mammalian pathogenesis*. Mol Microbiol, 2008. 69(2): p. 503-19.
58. Huws, S.A., et al., *Interactions of some common pathogenic bacteria with Acanthamoeba polyphaga*. FEMS Microbiol Lett, 2008. 282(2): p. 258-65.
59. Cornillon, S., et al., *Programmed cell death in Dictyostelium*. J Cell Sci, 1994. 107 (Pt 10): p. 2691-704.
60. Nasirudeen, A.M., et al., *Programmed cell death in a human intestinal parasite, Blastocystis hominis*. Parasitology, 2001. 123(Pt 3): p. 235-46.
61. Hueffer, K. and J.E. Galan, *Salmonella-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes*. Cell Microbiol, 2004. 6(11): p. 1019-25.
62. in *Epidemiologisches Bulletin* 2012, Robert Koch Institut.
63. Edwards, B.H., *Salmonella and Shigella species*. Clin Lab Med, 1999. 19(3): p. 469-87, v.
64. *Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis)*. RKI Ratgeber für Ärzte [pdf] 2011 2011; Available from: <http://edoc.rki.de/series/rki-ratgeber-fuer-arzte/2009/PDF/salmonellose-%28salmonellen-gastroenteritis%29.pdf>.
65. Adam, D., Doerr, H. W., Link, H., Lode, H., *Die Infektiologie*. 2004: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
66. Uzzau, S. and A. Fasano, *Cross-talk between enteric pathogens and the intestine*. Cell Microbiol, 2000. 2(2): p. 83-9.
67. Hurley, B.P. and B.A. McCormick, *Translating tissue culture results into animal models: the case of Salmonella typhimurium*. Trends Microbiol, 2003. 11(12): p. 562-9.
68. Santos, R.L., et al., *Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever*. Microbes Infect, 2001. 3(14-15): p. 1335-44.
69. Gulig, P.A. and R. Curtiss, 3rd, *Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100-kilobase plasmid of Salmonella typhimurium*. Infect Immun, 1988. 56(12): p. 3262-71.
70. Hensel, M., et al., *Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection*. Science, 1995. 269(5222): p. 400-3.
71. Köhler, W., *The BALB/c Mouse - Genetics and Immunology* Current Topics in Microbiology and Immunology, 1986. 122.
72. Tacket, C.O., et al., *Safety of live oral Salmonella typhi vaccine strains with deletions in htrA and aroC aroD and immune response in humans*. Infect Immun, 1997. 65(2): p. 452-6.

LITERATURVERZEICHNIS

73. Labrousse, A., et al., *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol*, 2000. 10(23): p. 1543-5.
74. Aballay, A., P. Yorgey, and F.M. Ausubel, *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2000. 10(23): p. 1539-42.
75. Foster, J.W. and H.K. Hall, *Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1990. 172(2): p. 771-8.
76. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. *Science*, 2004. 304(5668): p. 242-8.
77. Selbitz, H.-J., Sinell H.-J., Sziegoleit, A., *Das Salmonellen-Problem*. 1995, Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
78. Hardt, W.D., et al., *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*, 1998. 93(5): p. 815-26.
79. Brumell, J.H. and S. Grinstein, *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol*, 2004. 7(1): p. 78-84.
80. Chen, L.M., S. Hobbie, and J.E. Galan, *Requirement of CDC42 for Salmonella-induced cytoskeletal and nuclear responses*. *Science*, 1996. 274(5295): p. 2115-8.
81. Baumbler, A.J., *The record of horizontal gene transfer in Salmonella*. *Trends Microbiol*, 1997. 5(8): p. 318-22.
82. Hacker, J., et al., *Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution*. *Mol Microbiol*, 1997. 23(6): p. 1089-97.
83. Groisman, E.A. and H. Ochman, *How Salmonella became a pathogen*. *Trends Microbiol*, 1997. 5(9): p. 343-9.
84. Kubori, T., et al., *Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(18): p. 10225-30.
85. Macnab, R.M., *Flagella and Motility In Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Vol. 2. 1996, Washington DC: Cellular and Molecular Biology.
86. Galan, J.E. and A. Collmer, *Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells*. *Science*, 1999. 284(5418): p. 1322-8.
87. Mecsas, J.J. and E.J. Strauss, *Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands*. *Emerg Infect Dis*, 1996. 2(4): p. 270-88.
88. Kubori, T., et al., *Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system*. *Science*, 1998. 280(5363): p. 602-5.
89. Stender, S., et al., *Identification of SopE2 from Salmonella typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell*. *Mol Microbiol*, 2000. 36(6): p. 1206-21.
90. Friebel, A., et al., *SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell*. *J Biol Chem*, 2001. 276(36): p. 34035-40.
91. Terebiznik, M.R., et al., *Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella*. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(10): p. 766-73.
92. Zhou, D., et al., *A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization*. *Mol Microbiol*, 2001. 39(2): p. 248-59.
93. Fu, Y. and J.E. Galan, *A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion*. *Nature*, 1999. 401(6750): p. 293-7.
94. Kubori, T. and J.E. Galan, *Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation*. *Cell*, 2003. 115(3): p. 333-42.
95. Baumbler, A.J., et al., *Evolution of host adaptation in Salmonella enterica*. *Infect Immun*, 1998. 66(10): p. 4579-87.
96. Collier-Hyams, L.S., et al., *Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway*. *J Immunol*, 2002. 169(6): p. 2846-50.
97. Hacker, J., Dobrindt, U., *Pathogenomics. Genome Analysis of Pathogenic Microbes*. 2006, Weinheim: Wiley-VCH.
98. Miold, S., et al., *Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(17): p. 9845-50.

LITERATURVERZEICHNIS

99. Mirold, S., et al., *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. J Bacteriol, 2001. 183(7): p. 2348-58.
100. Prasad, R., et al., *Expression and characterization of the cloned Salmonella typhimurium enterotoxin*. Microb Pathog, 1992. 13(2): p. 109-21.
101. CLARKE und GYLES, *Salmonella*. Iowe State University Press. 1993: Iowe State University Press.
102. Benjamin, W.H., Jr., et al., *The ability of Salmonella typhimurium to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid*. Infect Immun, 1985. 50(2): p. 392-7.
103. Titball, R.W., *Bacterial phospholipases C*. Microbiol Rev, 1993. 57(2): p. 347-66.
104. Bunting, M., et al., *Alpha toxin from Clostridium perfringens induces proinflammatory changes in endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. 100(3): p. 565-74.
105. Terada, L.S., et al., *Pseudomonas aeruginosa hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity*. Infect Immun, 1999. 67(5): p. 2371-6.
106. Ames, G.F., *Lipids of Salmonella typhimurium and Escherichia coli: structure and metabolism*. J Bacteriol, 1968. 95(3): p. 833-43.
107. Bender, J., et al., *Phospholipase PlaB of Legionella pneumophila represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis*. J Biol Chem, 2009. 284(40): p. 27185-94.
108. Schunder, E., et al., *Phospholipase PlaB is a new virulence factor of Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol, 2010. 300(5): p. 313-23.
109. Banerji, S., P. Aurass, and A. Flieger, *The manifold phospholipases A of Legionella pneumophila - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence*. Int J Med Microbiol, 2008. 298(3-4): p. 169-81.
110. Ramrakhiani, L. and S. Chand, *Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity*. Appl Biochem Biotechnol, 2011. 164(7): p. 991-1022.
111. Arpigny, J.L. and K.E. Jaeger, *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. Biochem J, 1999. 343 Pt 1: p. 177-83.
112. Mignery, G.A., C.S. Pikaard, and W.D. Park, *Molecular characterization of the patatin multigene family of potato*. Gene, 1988. 62(1): p. 27-44.
113. Banerji, S. and A. Flieger, *Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria?* Microbiology, 2004. 150(Pt 3): p. 522-5.
114. Rydel, T.J., et al., *The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad*. Biochemistry, 2003. 42(22): p. 6696-708.
115. Schrag, J.D. and M. Cygler, *Lipases and alpha/beta hydrolase fold*. Methods Enzymol, 1997. 284: p. 85-107.
116. Hirschberg, H.J., et al., *Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A*. Eur J Biochem, 2001. 268(19): p. 5037-44.
117. Kienesberger, P.C., et al., *Identification of an insulin-regulated lysophospholipase with homology to neuropathy target esterase*. J Biol Chem, 2008. 283(9): p. 5908-17.
118. Istivan, T.S. and P.J. Coloe, *Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis*. Microbiology, 2006. 152(Pt 5): p. 1263-74.
119. Kohler, G.A., et al., *Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1761(11): p. 1391-9.
120. Songer, J.G., *Bacterial phospholipases and their role in virulence*. Trends Microbiol, 1997. 5(4): p. 156-61.
121. Stavru, F., C. Archambaud, and P. Cossart, *Cell biology and immunology of Listeria monocytogenes infections: novel insights*. Immunol Rev, 2011. 240(1): p. 160-84.
122. Raynaud, C., et al., *Phospholipases C are involved in the virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2002. 45(1): p. 203-17.
123. Audet, A., G. Nantel, and P. Proulx, *Phospholipase A activity in growing Escherichia coli cells*. Biochim Biophys Acta, 1974. 348(3): p. 334-43.
124. Teyssie, N., J.A. Boudier, and D. Raoult, *Rickettsia conorii entry into Vero cells*. Infect Immun, 1995. 63(1): p. 366-74.

LITERATURVERZEICHNIS

125. Saxena, M., J.K. Gupta, and D.V. Vadehra, *Factors affecting intra- and extracellular phospholipase A1 production by Salmonella newport*. Folia Microbiol (Praha), 1989. 34(3): p. 195-201.
126. Saxena, M., J.K. Gupta, and D.V. Vadehra, *Phospholipase A production by isolates of Salmonella species*. Indian J Med Res, 1990. 91: p. 177-81.
127. Baloda, S.B., et al., *Cytotoxic enterotoxins and cytotoxic factors produced by Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium*. Toxicon, 1983. 21(6): p. 785-96.
128. Galliard, T., *The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers*. Biochem J, 1971. 121(3): p. 379-90.
129. Racusen, D., *Esterase specificity of patatin from two potato cultivars*. Canadian Journal of Botany, 1986. 64(9): p. 2104-2106.
130. Andrews, D.L., et al., *Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (Solanum tuberosum) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector*. Biochem J, 1988. 252(1): p. 199-206.
131. Sato, H. and D.W. Frank, *ExoU is a potent intracellular phospholipase*. Mol Microbiol, 2004. 53(5): p. 1279-90.
132. Allewelt, M., et al., *Acquisition of expression of the Pseudomonas aeruginosa ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread*. Infect Immun, 2000. 68(7): p. 3998-4004.
133. Finck-Barbancon, V., et al., *ExoU expression by Pseudomonas aeruginosa correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury*. Mol Microbiol, 1997. 25(3): p. 547-57.
134. Pukatzki, S., R.H. Kessin, and J.J. Mekalanos, *The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(5): p. 3159-64.
135. Miyata, S., et al., *Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Infect Immun, 2003. 71(5): p. 2404-13.
136. Hauser, A.R. and J.N. Engel, *Pseudomonas aeruginosa induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells*. Infect Immun, 1999. 67(10): p. 5530-7.
137. Hauser, A.R., P.J. Kang, and J.N. Engel, *PepA, a secreted protein of Pseudomonas aeruginosa, is necessary for cytotoxicity and virulence*. Mol Microbiol, 1998. 27(4): p. 807-18.
138. Vallis, A.J., et al., *Biological effects of Pseudomonas aeruginosa type III-secreted proteins on CHO cells*. Infect Immun, 1999. 67(4): p. 2040-4.
139. Ben-Barak, Z., et al., *The expression of the virulence-associated effector protein gene avrA is dependent on a Salmonella enterica-specific regulatory function*. Int J Med Microbiol, 2006. 296(1): p. 25-38.
140. Faber, F., *Vorkommen und Expression des Virulenz- assoziierten Effektorproteins SptP von Salmonella enterica.*, 2007, Martin Luther- Universität: Halle- Wittenberg.
141. Wille, S., *Das Virulenz- assoziierte Effektorprotein SopA von S. enterica - Vorkommen, Polymorphismus und Expression.*, 2007, FH Anhalt: Bernburg.
142. Wolf, A.C., *Herstellung, Reinigung und Antikörper- gestützter Nachweis der Virulenz- assoziierten Inositol- 4- Phosphatase SopB von S. enterica.*, 2004, FH Anhalt: Bernburg.
143. Streckel, W., et al., *Expression profiles of effector proteins SopB, SopDI, SopEI, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of Salmonella enterica*. Mol Nutr Food Res, 2004. 48(7): p. 496-503.
144. Cherepanov, P.P. and W. Wackernagel, *Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant*. Gene, 1995. 158(1): p. 9-14.
145. Valdivia, R.H. and S. Falkow, *Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of Salmonella typhimurium acid-inducible promoters by differential fluorescence induction*. Mol Microbiol, 1996. 22(2): p. 367-78.
146. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6640-5.

LITERATURVERZEICHNIS

147. Wang, R.F. and S.R. Kushner, *Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in Escherichia coli*. Gene, 1991. 100: p. 195-9.
148. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
149. Murphy, K.C., *Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998. 180(8): p. 2063-71.
150. Gu, P., et al., *One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in Escherichia coli*. Microb Cell Fact, 2012. 11: p. 30.
151. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
152. Aurass, P., et al., *bdhA-patD operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of Legionella pneumophila mutants defective for amoeba infection*. Appl Environ Microbiol, 2009. 75(13): p. 4506-15.
153. Hartl, D.L. and H. Ochman, *Inverse polymerase chain reaction*. Methods Mol Biol, 1994. 31: p. 187-96.
154. Ochman, H., A.S. Gerber, and D.L. Hartl, *Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction*. Genetics, 1988. 120(3): p. 621-3.
155. Liberati, N.T., et al., *An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa strain PA14 transposon insertion mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(8): p. 2833-8.
156. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. 413(6858): p. 852-6.
157. McGhie, E.J., et al., *Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host*. Curr Opin Microbiol, 2009. 12(1): p. 117-24.
158. Jaschinski, K., *Expression und molekulare Charakterisierung des Virulenz- assoziierten Effektorproteins AvrA in homologen und heterologen Wirten.*, 2008, Martin- Luther- Universität: Halle- Wittenberg.
159. Fields, P.I., et al., *Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(14): p. 5189-93.
160. Akeda, Y. and J.E. Galan, *Genetic analysis of the Salmonella enterica type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains*. J Bacteriol, 2004. 186(8): p. 2402-12.
161. Eichelberg, K., C.C. Ginocchio, and J.E. Galan, *Molecular and functional characterization of the Salmonella typhimurium invasion genes invB and invC: homology of InvC to the F0F1 ATPase family of proteins*. J Bacteriol, 1994. 176(15): p. 4501-10.
162. Hong, K.H. and V.L. Miller, *Identification of a novel Salmonella invasion locus homologous to Shigella ipgDE*. J Bacteriol, 1998. 180(7): p. 1793-802.
163. Shea, J.E., et al., *Influence of the Salmonella typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse*. Infect Immun, 1999. 67(1): p. 213-9.
164. Mackaness, G.B., R.V. Blanden, and F.M. Collins, *Host-parasite relations in mouse typhoid*. J Exp Med, 1966. 124(4): p. 573-83.
165. Blaser, M.J. and L.S. Newman, *A review of human salmonellosis: I. Infective dose*. Rev Infect Dis, 1982. 4(6): p. 1096-106.
166. Schwan, W.R. and D.J. Kopecko, *Serovar specific differences in Salmonella survival within macrophage cells*. Adv Exp Med Biol, 1997. 412: p. 277-8.
167. Alpuche-Aranda, C.M., et al., *Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes*. J Exp Med, 1994. 179(2): p. 601-8.
168. Buchmeier, N.A. and F. Heffron, *Intracellular survival of wild-type Salmonella typhimurium and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages*. Infect Immun, 1989. 57(1): p. 1-7.
169. Vladoianu, I.R., H.R. Chang, and J.C. Pechere, *Expression of host resistance to Salmonella typhi and Salmonella typhimurium: bacterial survival within macrophages of murine and human origin*. Microb Pathog, 1990. 8(2): p. 83-90.
170. Post, L.E., et al., *DNA sequence of the promoter region for the alpha ribosomal protein operon in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1980. 255(10): p. 4653-59.
171. Wildschutte, H., et al., *Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in Salmonella*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10644-9.

LITERATURVERZEICHNIS

172. Hales, L.M. and H.A. Shuman, *The Legionella pneumophila rpoS gene is required for growth within Acanthamoeba castellanii*. J Bacteriol, 1999. 181(16): p. 4879-89.
173. Wilmes-Riesenberg, M.R., J.W. Foster, and R. Curtiss, 3rd, *An altered rpoS allele contributes to the avirulence of Salmonella typhimurium LT2*. Infect Immun, 1997. 65(1): p. 203-10.
174. Lee, I.S., et al., *The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1995. 17(1): p. 155-67.
175. Tyndall, R.L. and E.L. Domingue, *Cocultivation of Legionella pneumophila and free-living amoebae*. Appl Environ Microbiol, 1982. 44(4): p. 954-9.
176. Wexler, M., et al., *TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export*. J Biol Chem, 2000. 275(22): p. 16717-22.
177. Petersen, T.N., et al., *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat Methods, 2011. 8(10): p. 785-6.
178. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. 157(1): p. 105-32.
179. Jehl, M.A., R. Arnold, and T. Rattei, *Effective--a database of predicted secreted bacterial proteins*. Nucleic Acids Res, 2011. 39(Database issue): p. D591-5.
180. Muffler, A., et al., *The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in Escherichia coli*. EMBO J, 1996. 15(6): p. 1333-9.
181. Becker, G., E. Klauck, and R. Hengge-Aronis, *Regulation of RpoS proteolysis in Escherichia coli: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(11): p. 6439-44.
182. Pruteanu, M. and R. Hengge-Aronis, *The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for sigmaS proteolysis: implications for RssB regulation and signal transduction in sigmaS turnover in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2002. 45(6): p. 1701-13.
183. Studemann, A., et al., *Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX*. EMBO J, 2003. 22(16): p. 4111-20.
184. Moreno, M., et al., *Regulation of sigma S degradation in Salmonella enterica var typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA(RssB) and ClpX*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000. 2(2): p. 245-54.
185. Bearson, S.M., et al., *Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene mviA of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1996. 178(9): p. 2572-9.
186. Swords, W.E. and W.H. Benjamin, Jr., *Mouse virulence gene A (mviA+) is a pleiotropic regulator of gene expression in Salmonella typhimurium*. Ann N Y Acad Sci, 1994. 730: p. 295-6.
187. Benjamin, W.H., Jr., et al., *The Salmonella typhimurium locus mviA regulates virulence in Itys but not Ityr mice: functional mviA results in avirulence; mutant (nonfunctional) mviA results in virulence*. J Exp Med, 1991. 174(5): p. 1073-83.
188. Kall, L., A. Krogh, and E.L. Sonnhammer, *A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method*. J Mol Biol, 2004. 338(5): p. 1027-36.
189. Reynolds, S.M., et al., *Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks*. PLoS Comput Biol, 2008. 4(11): p. e1000213.
190. Schmieger, H., *Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities*. Mol Gen Genet, 1972. 119(1): p. 75-88.
191. Marquardt, M., *Regulation der σ^S - Untereinheit der RNA- Polymerase durch die patatin-ähnliche Phospholipase RssA in Escherichia coli.*, 2007, Freie Universität: Berlin.
192. Hemmingsen, S.M., et al., *Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly*. Nature, 1988. 333(6171): p. 330-4.
193. Shohdy, N., et al., *Pathogen effector protein screening in yeast identifies Legionella factors that interfere with membrane trafficking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(13): p. 4866-71.
194. Hauser, A.R., et al., *Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med, 2002. 30(3): p. 521-8.

LITERATURVERZEICHNIS

195. Berthelot, P., et al., *Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas aeruginosa bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes*. J Infect Dis, 2003. 188(4): p. 512-8.
196. Chaudhuri, R.R., et al., *Comprehensive identification of Salmonella enterica serovar typhimurium genes required for infection of BALB/c mice*. PLoS Pathog, 2009. 5(7): p. e1000529.
197. Pukatzki, S., et al., *Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(5): p. 1528-33.
198. Cosson, P. and T. Soldati, *Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2008. 11(3): p. 271-6.
199. Abu Kwaik, Y., et al., *Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis*. Appl Environ Microbiol, 1998. 64(9): p. 3127-33.
200. Silver, J. and V. Keerikatte, *Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus*. J Virol, 1989. 63(5): p. 1924-8.
201. Ducey, T.F., and Dyer, D. W., *Rapid Identification of EZ::TNTM Transposon Insertion Sites in the Genome of Neisseria gonorrhoeae*. EPICENTRE Forum, 2002. 9: p. 6-7.
202. Park, Y.J., et al., *Analysis of virulence and growth of a purine auxotrophic mutant of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae*. FEMS Microbiol Lett, 2007. 276(1): p. 55-9.
203. Baumbler, A.J. and F. Heffron, *Identification and sequence analysis of lpfABCDE, a putative fimbrial operon of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1995. 177(8): p. 2087-97.
204. Baumbler, A.J., R.M. Tsolis, and F. Heffron, *The lpf fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(1): p. 279-83.
205. Johansson, H., et al., *Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1576(1-2): p. 53-8.
206. Walsh, E.C. and D.Y. Stainier, *UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish*. Science, 2001. 293(5535): p. 1670-3.
207. Chang, K.W., S.F. Weng, and Y.H. Tseng, *UDP-glucose dehydrogenase gene of Xanthomonas campestris is required for virulence*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 287(2): p. 550-5.
208. Marchal, K., et al., *In silico identification and experimental validation of PmrAB targets in Salmonella typhimurium by regulatory motif detection*. Genome Biol, 2004. 5(2): p. R9.
209. Gunn, J.S., et al., *PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance*. Mol Microbiol, 1998. 27(6): p. 1171-82.
210. Groisman, E.A., J. Kayser, and F.C. Soncini, *Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments*. J Bacteriol, 1997. 179(22): p. 7040-5.
211. Michener, H.D. and R.P. Elliott, *Minimum Growth Temperatures for Food-Poisoning, Fecal-Indicator, and Psychrophilic Microorganisms*. Adv Food Res, 1964. 13: p. 349-96.
212. Matches R., L.J., *Low Temperature Growth of Salmonella*. JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 1968. 33: p. 641- 645.
213. Francis, C.L., M.N. Starnbach, and S. Falkow, *Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with Salmonella typhimurium grown under low-oxygen conditions*. Mol Microbiol, 1992. 6(21): p. 3077-87.
214. Galan, J.E. and R. Curtiss, 3rd, *Expression of Salmonella typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling*. Infect Immun, 1990. 58(6): p. 1879-85.
215. Valdivia, R.H. and S. Falkow, *Probing bacterial gene expression within host cells*. Trends Microbiol, 1997. 5(9): p. 360-3.
216. Deiwick, J., et al., *Mutations in Salmonella pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPII genes and resistance to antimicrobial agents*. J Bacteriol, 1998. 180(18): p. 4775-80.
217. Ehrbar, K., *Integration of horizontally transferred effectors into the complex network of the type III secretion system of Salmonella Typhimurium*, 2003, Swiss Federal Institute of Technology Zürich: Zürich.

LITERATURVERZEICHNIS

218. Hayward, R.D. and V. Koronakis, *Direct modulation of the host cell cytoskeleton by Salmonella actin-binding proteins*. Trends Cell Biol, 2002. 12(1): p. 15-20.
219. Hanisch, J., et al., *Molecular dissection of Salmonella-induced membrane ruffling versus invasion*. Cell Microbiol, 2010. 12(1): p. 84-98.
220. Gruenheid, S. and B.B. Finlay, *Microbial pathogenesis and cytoskeletal function*. Nature, 2003. 422(6933): p. 775-81.
221. Zhou, D. and J. Galan, *Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins*. Microbes Infect, 2001. 3(14-15): p. 1293-8.
222. Zhang, S., et al., *The Salmonella enterica serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves*. Infect Immun, 2002. 70(7): p. 3843-55.
223. Gunn, J.S., et al., *Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium*. Infect Immun, 2000. 68(11): p. 6139-46.
224. Kato, A., T. Latifi, and E.A. Groisman, *Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(8): p. 4706-11.
225. Zhao, Y., et al., *Identification of genes affecting Salmonella enterica serovar enteritidis infection of chicken macrophages*. Infect Immun, 2002. 70(9): p. 5319-21.
226. Marin K., K.R., *Import und Export von Aminosäuren in Bakterien*, in BIOSpektrum2009. p. 600-604.
227. Meibom, K.L. and A. Charbit, *Francisella tularensis metabolism and its relation to virulence*. Front Microbiol, 2010. 1: p. 140.
228. Garcia-del Portillo, F., et al., *Growth control in the Salmonella-containing vacuole*. Curr Opin Microbiol, 2008. 11(1): p. 46-52.
229. McFarland, W.C. and B.A. Stocker, *Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of Salmonella dublin and of two strains of Salmonella typhimurium*. Microb Pathog, 1987. 3(2): p. 129-41.
230. Stocker, B.A., *Auxotrophic Salmonella typhi as live vaccine*. Vaccine, 1988. 6(2): p. 141-5.
231. Stocker, B.A., *Aromatic-dependent Salmonella as live vaccine presenters of foreign epitopes as inserts in flagellin*. Res Microbiol, 1990. 141(7-8): p. 787-96.
232. Stocker, B.A., *Aromatic-dependent salmonella as anti-bacterial vaccines and as presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them*. J Biotechnol, 2000. 83(1-2): p. 45-50.
233. Chatfield, S., et al., *The use of live attenuated Salmonella for oral vaccination*. Dev Biol Stand, 1994. 82: p. 35-42.
234. Chatfield, S.N., et al., *The development of oral vaccines against parasitic diseases utilizing live attenuated Salmonella*. Parasitology, 1995. 110 Suppl: p. S17-24.
235. Baumler, A.J., et al., *Salmonella typhimurium loci involved in survival within macrophages*. Infect Immun, 1994. 62(5): p. 1623-30.
236. Hensel, M., et al., *Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of Salmonella Pathogenicity Island 2*. Mol Microbiol, 1997. 24(1): p. 155-67.
237. Leung, K.Y. and B.B. Finlay, *Intracellular replication is essential for the virulence of Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(24): p. 11470-4.
238. Chakravorty, D., I. Hansen-Wester, and M. Hensel, *Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates*. J Exp Med, 2002. 195(9): p. 1155-66.
239. Bowie, F., et al., *Virulence, persistence, and immunogenicity of Yersinia enterocolitica O:8 aroA mutants*. Infect Immun, 1989. 57(10): p. 3234-6.
240. Ahmed, Z.U., M.R. Sarker, and D.A. Sack, *Protection of adult rabbits and monkeys from lethal shigellosis by oral immunization with a thymine-requiring and temperature-sensitive mutant of Shigella flexneri Y*. Vaccine, 1990. 8(2): p. 153-8.
241. KEGG - Purine metabolism - reference pathway. [html]; Available from: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00230.html>.

LITERATURVERZEICHNIS

242. Baumler, A.J., R.M. Tsolis, and F. Heffron, *Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by Salmonella typhimurium*. Infect Immun, 1996. 64(5): p. 1862-5.
243. Perez-Serrano, J., et al., *In vitro shock response to different stressors in free living and pathogenic Acanthamoeba*. Int J Parasitol, 2000. 30(7): p. 829-35.
244. Galan, J.E., *Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells*. Mol Microbiol, 1996. 20(2): p. 263-71.
245. Marcus, S.L., et al., *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. Microbes Infect, 2000. 2(2): p. 145-56.
246. Ibarra, J.A., et al., *Induction of Salmonella pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect Salmonella-host cell interactions in vitro*. Microbiology, 2010. 156(Pt 4): p. 1120-33.
247. Gahring, L.C., et al., *Invasion and replication of Salmonella typhimurium in animal cells*. Infect Immun, 1990. 58(2): p. 443-8.
248. Douesnard-Malo, F. and F. Daigle, *Increased Persistence of Salmonella enterica Serovar Typhi in the Presence of Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol, 2011. 77(21): p. 7640-6.
249. Jeong, H.J., et al., *Acanthamoeba: could it be an environmental host of Shigella?* Exp Parasitol, 2007. 115(2): p. 181-6.
250. Essig, A., et al., *Infection of Acanthamoeba castellanii by Chlamydia pneumoniae*. Appl Environ Microbiol, 1997. 63(4): p. 1396-9.
251. Marolda, C.L., et al., *Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the Burkholderia cepacia complex in free-living amoebae*. Microbiology, 1999. 145 (Pt 7): p. 1509-17.
252. Goulsbra, A.M., C. Edwards, and M.P. Gallagher, *Surface hygiene monitored using a reporter of fis in Escherichia coli*. J Appl Microbiol, 2001. 91(1): p. 104-9.
253. Misselwitz, B., et al., *RNAi screen of Salmonella invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and Cdc42*. Mol Syst Biol, 2011. 7: p. 474.
254. Anjum, M.F., et al., *Identification of core and variable components of the Salmonella enterica subspecies I genome by microarray*. Infect Immun, 2005. 73(12): p. 7894-905.
255. Baker, S. and G. Dougan, *The genome of Salmonella enterica serovar Typhi*. Clin Infect Dis, 2007. 45 Suppl 1: p. S29-33.
256. McQuiston, J.R., et al., *Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among Salmonella species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events*. J Bacteriol, 2008. 190(21): p. 7060-7.
257. Parkhill, J., et al., *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18*. Nature, 2001. 413(6858): p. 848-52.
258. Cole, S.T., et al., *Massive gene decay in the leprosy bacillus*. Nature, 2001. 409(6823): p. 1007-11.
259. Phillips, R.M., et al., *In vivo phospholipase activity of the Pseudomonas aeruginosa cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors*. J Biol Chem, 2003. 278(42): p. 41326-32.
260. Tamura, M., et al., *Lysophospholipase A activity of Pseudomonas aeruginosa type III secretory toxin ExoU*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 316(2): p. 323-31.
261. Dowhan, W., *Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?* Annu Rev Biochem, 1997. 66: p. 199-232.
262. Yung, B.Y. and A. Kornberg, *Membrane attachment activates dnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(19): p. 7202-5.
263. Sekimizu, K., B.Y. Yung, and A. Kornberg, *The dnaA protein of Escherichia coli. Abundance, improved purification, and membrane binding*. J Biol Chem, 1988. 263(15): p. 7136-40.
264. Crooke, E., C.E. Castuma, and A. Kornberg, *The chromosome origin of Escherichia coli stabilizes DnaA protein during rejuvenation by phospholipids*. J Biol Chem, 1992. 267(24): p. 16779-82.

LITERATURVERZEICHNIS

265. Hwang, D.S., E. Crooke, and A. Kornberg, *Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein*. J Biol Chem, 1990. 265(31): p. 19244-8.
266. Krishna, P., et al., *Are many Z-DNA binding proteins actually phospholipid-binding proteins?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(4): p. 1292-5.
267. Krishna, P. and J.H. van de Sande, *Interaction of RecA protein with acidic phospholipids inhibits DNA-binding activity of RecA*. J Bacteriol, 1990. 172(11): p. 6452-8.
268. Mizushima, T., S. Natori, and K. Sekimizu, *Inhibition of Escherichia coli DNA topoisomerase I activity by phospholipids*. Biochem J, 1992. 285 (Pt 2): p. 503-6.
269. den Blaauwen, T. and A.J. Driessen, *Sec-dependent preprotein translocation in bacteria*. Arch Microbiol, 1996. 165(1): p. 1-8.
270. Sitkiewicz, I., et al., *Emergence of a bacterial clone with enhanced virulence by acquisition of a phage encoding a secreted phospholipase A2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(43): p. 16009-14.
271. Nagiec, M.J., et al., *Analysis of a novel prophage-encoded group A Streptococcus extracellular phospholipase A(2)*. J Biol Chem, 2004. 279(44): p. 45909-18.
272. Hueck, C.J., *Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(2): p. 379-433.
273. McMorran, B., et al., *Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to Pseudomonas aeruginosa infection*. Infect Immun, 2003. 71(10): p. 6035-44.
274. VanRheenen, S.M., et al., *Members of a Legionella pneumophila family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells*. Infect Immun, 2006. 74(6): p. 3597-606.
275. Backert, S. and T.F. Meyer, *Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2006. 9(2): p. 207-17.
276. Schlumberger, M.C. and W.D. Hardt, *Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings*. Curr Opin Microbiol, 2006. 9(1): p. 46-54.
277. Gerlach, R.G., et al., *Salmonella Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type I secretion system*. Cell Microbiol, 2007. 9(7): p. 1834-50.
278. Delepelaire, P. and C. Wandersman, *Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from Erwinia chrysanthemi contains a C-terminal secretion signal analogous to that of Escherichia coli alpha-hemolysin*. J Biol Chem, 1990. 265(28): p. 17118-25.

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt, ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstabencode abgekürzt.

<i>A.</i>	<i>Acanthamoeba</i>
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure(n)
B	Berlin
bp	Basenpaar
<i>cfu</i>	<i>colony forming units</i> / Koloniebildende Einheiten
°C	Grad Celsius
DNA (engl.)	Desoxyribonucleic acid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> , und andere
FFA	Freie Fettsäuren
FKS	fötales Kälberserum
FLP	„Flippase“
FRT	<i>FLP recognition target</i>
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	bidest doppelt destilliertes, steriles Wasser
IL	Interleukin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycinresistenzkassette
<i>L</i>	<i>Legionella</i>
LB	Luria Bertani
log	Logarithmus
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
OD	Optische Dichte
rpm	<i>rotation per minute</i> / Umdrehungen je Minute
PAI	Pathogenitätsinsel
p.i.	post infection/ nach Infektion
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
s.	siehe
sc	Scatterklon(e)
Sop	<i>Salmonella outer protein</i>
SPI	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Plural)
STM	<i>Salmonella enterica</i> subspezies <i>enterica</i> serovar Typhimurium

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tab.	Tabelle
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
W	Wernigerode
WT	Wildtyp

Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin
T	Desoxythymidin

Nomenklatur

<i>yjjU</i>	Genbezeichnung
YjjU	Proteinbezeichnung

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R
Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N
Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D
Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C
Prolin	Pro	P
Glutamat	Glu	E
Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q
Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G
Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H
Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I
Valin	Val	V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung

1.1:	Taxonomische Einteilung der Gattung <i>Salmonella</i> .	2
1.2:	Pathogenese einer <i>Salmonella</i> -Infektion.	10
1.3:	Der Typ-III-Translokationsapparat von <i>Salmonella</i> im Vergleich zum bakteriellen Flagellensystem.	12
1.4:	Organisation des Genoms pathogener Salmonellen am Beispiel des Stammes <i>S. Typhimurium</i> LT2 hinsichtlich verschiedener Virulenzfaktoren.	14
1.5:	Trennstellen bei der Spaltung durch Phospholipasen.	15
M 3.1:	Schematische Darstellung einer genomischen Integration nach Datsenko und Wanner.	44
M 3.2:	Schematische Darstellung der Helferplasmide.	45
M 3.3:	Schematische Darstellung der Mutagenese mittels P22 Phagentransduktion.	46
M 3.4:	Schematische Darstellung des Western Blot-Aufbaus in der Blotting-Kammer.	53
M 3.5:	Schematische Darstellung des Screens auf Suszeptibilität gegenüber Amöben.	57
4.1:	Charakteristischer Scatterphänotyp.	64
4.2:	Bildung des <i>Salmonella</i> Scatterphänotyps bei etablierten STM Virulenzmutanten.	65
4.3:	Wachstumsverhalten von STM LT2 Wildtyp und frühen Scatterklonen in LB-Medium.	73
4.4:	HeLa-Infektion mit etablierten STM 14028 virulenzdefekten Mutanten.	74
4.5:	HeLa-Infektion mit STM LT2 WT und sc 3 = <i>purD::Tn5</i> .	75
4.6:	U937-Infektion mit etablierten STM 14028 virulenzdefekten Mutanten.	76
4.7:	U937-Infektion mit STM LT2 WT und sc 3 = <i>purD::Tn5</i> .	77
4.8:	RAW-Infektion mit STM LT2 WT und sc 3 = <i>purD::Tn5</i> .	78
4.9:	Makrophageninfektion mit <i>Salmonella</i> (pFPV25.1).	81
4.10:	Mikroskopische Auswertung einer Makrophageninfektion mit <i>Salmonella</i> (pFPV25.1).	82
4.11:	<i>A. castellanii</i> Infektion mit <i>Salmonella</i> (pFPV25.1).	84
4.12:	Differentielle Immunfärbung einer Makrophageninfektion mit <i>Salmonella</i> .	84
4.13:	STM <i>rpoS</i> -Mutanten in etablierten humanen Infektionsmodellen.	88
4.14:	Plaqueassay auf NNA-Agarplatten.	89
4.15:	Aminosäuresequenzvergleich der Patatin-ähnlichen Proteine YjjU und YchK aus <i>Salmonella</i> und homologen Proteinen.	92
4.16:	Schematische Darstellung der Gene in der Region um STM <i>yjjU</i> .	94
4.17:	Schematische Darstellung der Gene in der Region um STM <i>ychK</i> .	95
4.18:	Verifizierung kanamycinresistenter STM 14028 PLP <i>knockout</i> -Mutanten.	97
4.19:	Verifizierung markerloser STM 14028 PLP <i>knockout</i> -Mutanten.	98
4.20:	STM 14028 PLP <i>knockout</i> -Mutanten bilden keinen <i>small colony morphology</i> Phänotyp.	99
4.21:	Wachstumsverhalten von STM 14028 und isogenen PLP <i>knockout</i> -Mutanten in LB-Medium.	100
4.22:	Analyse der lipolytischen Aktivität gegenüber DPPG von PLP in STM 14028 8h Zelllysaten.	101
4.23:	Testung der lipolytischen Aktivität von STM PLP in <i>E. coli</i> .	103
4.24:	Affinitätschromatographische Reinigung aller STM PLP und Nachweis von YjjU-V5/ 6×His im Western Blot und SDS-PAGE.	104
4.25:	Nachweis des rekombinanten STM PLP YchK-V5/ 6×His und YchK ^{S41A} -V5/ 6×His.	105
4.26:	Vergleichender Western Blot der gereinigten rekombinanten STM PLP.	106
4.27:	Analyse der lipolytischen Aktivität gereinigter STM PLP.	106
4.28:	Western Blot Analyse zum Sekretionsnachweis der PLP in <i>Salmonella</i> .	108
4.29:	STM 14028 PLP Mutanten sind in etablierte Infektionsmodellen nicht attenuiert.	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle

1.1:	Auflistung relevanter SPI-1 sekretierter Effektorproteine.	13
M 2.1:	Auflistung der verwendeten Geräte.	20
M 2.2:	Auflistung spezieller Materialien.	20
M 2.3:	Auflistung der verwendeten Chemikalien.	21
M 2.4:	Auflistung der Lipidsubstrate.	22
M 2.5:	Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.	22
M 2.6:	Auflistung verwendeter Enzyme, Standards und Antikörper.	23
M 2.7:	Auflistung verwendeter Restriktionsendonukleasen.	23
M 2.8:	Auflistung verwendeter Antikörper für Western Blot.	24
M 2.9:	Auflistung der verwendeten Analyse-Kits.	24
M 2.10:	Auflistung der erworbenen Plasmide.	24
M 2.11:	Auflistung der in dieser Arbeit erzeugten Plasmide.	25
M 2.12:	Auflistung verwendeter Oligonukleotide.	25
M 2.13:	Auflistung verwendeter Bakterienstämme der RKI Stammsammlung.	28
M 2.14:	Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zelllinien.	28
M 2.15:	Auflistung verwendeter und erzeugter gentechnisch veränderter Organismen (GVO).	28
M 2.16:	Auflistung der Nährmedien zur Anzucht von <i>Salmonella</i> und <i>Escherichia coli</i> .	30
M 2.17:	Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von <i>A. castellanii</i> und zur Infektion der Amöben mit <i>Salmonella</i> .	31
M 2.18:	Auflistung des Nährmediums für die Kultivierung und Infektion von U937-Makrophagen.	31
M 2.19:	Auflistung des Nährmediums für die Kultivierung und Infektion von HeLa-Zellen.	31
M 2.20:	Auflistung verwendeter Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium.	32
M 2.21:	Verwendete Software und Internet-Datenbanken.	32
M 3.1:	Reaktionsansatz für eine Standard- und Kolonie-PCR.	41
M 3.2:	PCR-Programm für eine Standard- und Kolonie-PCR.	41
M 3.3:	Reaktionsansatz für eine RT-PCR.	42
M 3.4:	PCR-Programm für eine RT-PCR.	42
M 3.5:	Reaktionsansatz für eine QuickChange-PCR.	42
M 3.6:	PCR-Programm für eine QuickChange-Reaktion.	43
M 3.7:	Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR.	43
M 3.8:	PCR-Programm für eine Sequenzierungs-Reaktion.	43
M 3.9:	Reaktionsansatz für eine KO-PCR.	45
M 3.10:	PCR-Programm für eine KO-Reaktion.	45
M 3.11:	Reaktionsansatz für eine inverse/ modifizierte inverse PCR.	58
M 3.12:	PCR-Programm für eine inverse PCR.	58
M 3.13:	PCR-Programm für eine modifizierte inverse PCR.	58
4.1:	Daten zur statistischen Wahrscheinlichkeit der Genomabdeckung der Transposon-Mutagenese.	63
4.2:	Ergebnisse des Screens auf Suszeptibilität gegenüber Amöben der Transposon-mutagenisierten <i>Salmonella</i> Klonbänke.	66
4.3:	Nachweis der SPI-1 sekretierten Effektorproteine mittels Western Blot Analyse.	68
4.4:	Lokalisation des Tn5-Transposons in den einzelnen STM Scatterklonen.	70
4.5:	Versuchsbedingungen zur Etablierung eines Amöbeninfektionsmodells.	79
4.6:	Amöbenresistenztest verschiedener Bakterienstämme mit <i>Acanthamoeba castellanii</i> .	90
4.7:	Überblick der <i>in silico</i> Analyse der <i>Salmonella</i> Gene <i>yjyU</i> und <i>ychK</i> .	93

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran gilt mein Dank Prof. Dr. Antje Flieger für die Überlassung des Themas und ihre Unterstützung bei der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert und Herrn Prof. Dr. André Fleißner danke ich für die Übernahme des Co-Referats und den Prüfungsvorsitz.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Arbeitsgruppe: Dr. Christina Lang, Katja Kuhle, Maren Schlegel, Kathleen Seipel, Dr. Philipp Auraß, Dr. Sven Halbedel, Thomas Gerlach und Karan Kaval für die Energie und Motivationskraft, ihre Hilfsbereitschaft und die Freundschaft. Ein großer Dank gilt auch den TAs, vor allem Simone Dumschat, Susanne Karste und Birgitt Hahn für die Aufrechterhaltung der Laborstrukturen und Pflege der Zellkulturen. Wiebke Streckel danke ich für die unterstützende Zusammenarbeit bei den Effektorproteinuntersuchungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen „*Salmonella* Kollegen“, allen voran Dr. Roman Gerlach bedanken, der mich mit seiner fachlichen Kompetenz und Erfahrung unterstützt hat, sowie der gesamten NG3 des RKI, Dr. Wolfgang Rabsch und Sandra Simon, vielen Dank für die ständige Hilfsbereitschaft, anregenden Diskussionen und wertvollen Ratschläge.

Danken möchte ich auch allen Kollegen des Robert Koch-Instituts für das gute Arbeitsklima, sowie für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft in allen fachlichen und nichtfachlichen Fragen.

Der größte Dank geht an meine Eltern und meinem Bruder sowie an Tina, die mir während meiner Doktorarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützend zur Seite standen.

